

ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ОСЛОЖНЕННОМ ТЕЧЕНИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

Яковлев-Малых Н. Н.

*Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск,
кафедра клинической лабораторной диагностики*

Реферат. В настоящее время ведется активный поиск биомаркеров, которые способны предсказывать начало острых коронарных событий, таких как острый инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия ещё на доклиническом этапе их формирования.

На основании результатов исследования 92 пациентов с острым коронарным синдромом и 35 практически здоровых людей с использованием оригинальных отечественных тест-систем, созданных в ходе реализации программы «Диагностикумы» ГП «Импортозамещающая фармпродукция», показано, что у пациентов с осложнённым течением коронарной болезни отмечается снижение антиоксидантной защиты организма на фоне увеличения фосфолипазной активности и элевация ассоциированного с беременностью протеина плазмы-А, обладающего протеолитической активностью. Отмеченные метаболические изменения могут лежать в основе дестабилизации атеросклеротической бляшки, приводящие к осложненному течению заболевания.

Введение. Патология сердечно-сосудистой системы, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), является основной причиной летальных исходов во всём мире [1].

Наиболее опасной формой при коронарной патологии является острый коронарный синдром (ОКС). В Международной классификации болезней 10-го пересмотра не выделяют ОКС в отдельную нозологическую форму. Несмотря на это понятие «острый коронарный синдром» является общепризнанным, так как позволяет еще на догоспитальном этапе начать необходимое лечение, что соответственно повышает выживаемость при данной патологии. Под острым коронарным синдромом подразумевают любую группу клинических признаков (симптомов), позволяющих подозревать острый инфаркт миокарда (ОИМ) или нестабильную стенокардию (НС).

В настоящее время ОКС продолжает оставаться наиболее тяжелым проявлением и главной причиной летальных исходов при ишемической болезни сердца. Так, например, количество умерших от инфаркта миокарда вне стационара выросло на 19,5 % — с 524 в 2015 г. до 626 в 2016 г., а смертность от острых форм ИБС возросла на 0,57 % — с 3,85 % (от всех болезней системы кровообращения) в 2015 г. до 4,42 % в 2016 г. [2].

Известно, что основным патоморфологическим субстратом в развитии ОКС является повреждение коронарных сосудов, сопровождающееся формированием на поверхности артериального сосуда атеросклеротических бляшек, представляющих собой покрытые оболочкой очаги липидного детрита. Под влиянием ряда факторов атеросклеротическая бляшка делается нестабильной. При разрыве (повреждении) ее оболочки происходит эмболизация липидным детритом артериальных сосудов, что составляет угрозу развития острой ишемии с последующим возникновением очага некроза в миокарде, то есть острого инфаркта миокарда [3].

Согласно современным представлениям о генезе атеросклероза, важную роль в его становлении играет воспалительный процесс в стенке сосудов. Признаки локального неспецифического воспаления прослеживаются от самых ранних стадий развития атеросклеротического поражения стенки

сосуда до момента дестабилизации и повреждения атеросклеротической бляшки [4]. Как выяснилось, развитие воспалительного процесса инициируется дисфункцией эндотелия и повреждением мембран клеток продуктами свободнорадикального (перекисного) окисления липидов.

В периоде дестабилизации атеросклеротической бляшки стимулируется протеолитическая и фосфолипазная активность ряда ферментов, способных вызывать деструкцию оболочек клеток и лизировать белки межклеточного матрикса, что приводит к истончению фиброзной «покрышки» атеросклеротической бляшки с последующим ее разрывом [5].

Успехи в понимании многогранных механизмов атерогенеза и патогенеза ишемической болезни сердца обращают исследователей к поиску новых кардиомаркеров с целью более раннего выявления с их использованием состояний, осложняющих течение коронарной болезни. К тому же в период развития острых коронарных событий сердечно-сосудистая система испытывает дефицит антиоксидантной защиты (АОЗ). Изменения в состоянии антиоксидантной системы обычно связано с активацией процессов свободнорадикального окисления (СРО). Декомпенсированная аккумуляция продуктов СРО в сыворотке крови на фоне ослабления антиоксидантной защиты свидетельствует о наличии явного системного окислительного стресса (ОС) у пациентов с ОКС [6].

В последние годы достаточно большое количество исследований посвящено выявлению в крови пациентов с коронарной патологией метаболов отражающих активность ферментативных процессов, происходящих в атеросклеротических бляшках. Особое внимание привлекает маркер, который активно используют акушеры-гинекологи для скрининга генетических мутаций, а в последнее время его стали рассматривать как маркер эндогенной деструкции атеромы — это ассоциированный с беременностью протеин плазмы А (pregnancy-associated plasma protein А, PAPP-A).

PAPP-A (pappalysin 1) относится к группе цинксодержащих матриксных металлопротеиназ. Матриксные металлопротеиназы (MMPs) представляют собой большую группу (семейство насчитывает более 20 энзимов) структурно связанных протеолитических ферментов, которые содержат в своем активном домене ионы Zn^{2+} или Ca^{2+} . Основной биологической функцией этих энзимов является удаление компонентов внеклеточного матрикса [7].

Таким образом, исследования системы антиоксидантной защиты и определение концентрации биохимических маркеров дестабилизации атеросклеротической бляшки в период развития ОКС, позволяет диагностировать острую коронарную патологию до наступления фатальных изменений со стороны сердечно-сосудистой системы, а также определиться с целесообразностью проведения реперфузионной терапии.

Цель работы — научное обоснование методологии выявления метаболических изменений при осложненном течении ишемической болезни сердца с использованием отечественных инновационных технологий для оценки степени дестабилизации атеросклеротической бляшки, уровня локального неспецифического воспаления и состояния эндогенной системы антиоксидантной защиты организма.

Материалы и методы. Обследовано 92 пациента, в том числе 57 человек (23 мужчины и 34 женщины), поступивших в приемное отделение УЗ «1-я Городская клиническая больница» г. Минска, в подавляющем большинстве случаев через 6 часов от момента возникновения острых болей в области сердца. Средний возраст пациентов составил 66 лет.

Пациентам, экстренно поступившим в лечебно-профилактическое учреждение, был выставлен догоспитальный диагноз «острый коронарный синдром» (ОКС). В приемном отделении больницы всем им проводилось комплексное обследование, соответствующее протоколу оказания медицинской помощи пациентам с ОКС. На основании физикального осмотра, а также результатов инструментальных и лабораторных исследований пациентам были выставлены клинические диагнозы:

- инфаркт миокарда (I21¹) верифицирован у 17 пациентов — 1-я группа исследуемых лиц;
- нестабильная стенокардия (I20.0), 14 случаев — 2-я группа;
- атеросклеротическая болезнь сердца (I25.1), 20 случаев — 3-я группа;
- другие формы острой ишемической болезни сердца (I24), 6 случаев — 4-я группа, в последующем исключена из исследований.

Контрольную группу составили 35 человек, сопоставимых с исследуемыми пациентами с кардиологической патологией по возрасту и полу, не страдающих на момент исследования какими-либо «острыми» заболеваниями.

Взятие крови у пациентов осуществлялось в период их поступления в стационар, до верификации диагноза и до проведения реперфузионной (тромболитической, интервенционной, фармакоинтервенционной) терапии, путем венепункции локтевой вены в количестве 5 мл при помощи вакуумсодержащих систем Vacutainer®. Исследуемые образцы подвергались центрифугированию в течение 10 минут при 1500 об/мин на центрифуге Thermo Scientific CL 10 при температуре 20 °С. Полученную после центрифугирования сыворотку крови отбирали и хранили до исследования в морозильных камерах при температуре –20 °С. Лабораторные исследования биоматериала проводились в течение последующих нескольких суток.

Определение уровня PAPP-A в сыворотке крови пациентов осуществлялось иммунохимическим методом с электрохемилюминесцентной

¹ Коды болезней по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10).

детекцией (PAPP-A «Roche») на иммунохимическом анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics, Швейцария).

Для сопоставления показателей концентрации PAPP-A, определявшегося двумя методами, основанными на использовании разных технологий исследования, применялась наряду с импортной также отечественная тест-система на основе лантанидного иммунофлюориметрического анализа — PAPP-A «ЛИФМА» (ГНУ «Институт биоорганической химии», НАН Республики Беларусь).

Соответствующий набор реагентов, зарегистрированный Министерством здравоохранения Республики Беларусь в 2015 г., был создан в рамках задания «Наборы реагентов для определения ассоциированного с беременностью белка плазмы в сыворотке крови методами лантанидного иммунофлюориметрического и иммуноферментного анализа «ЛИФМА – PAPP-A» и «ИФА – PAPP-A» (научный руководитель д-р хим. наук О. В. Свиридов) подпрограммы «Диагностикумы» Государственной программы «Импортозамещающая фармпродукция» (Государственный заказчик НАН Беларуси).

Для подтверждения локального неспецифического воспаления при дестабилизации и повреждении атеросклеротической бляшки был использован отечественный набор реагентов по фотометрическому определению активности фосфолипазы A_2 — «ФЛА $_2$ -ФОА». Разработка и апробация биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта по фотометрическому определению активности панкреатической фосфолипазы A_2 в крови также осуществлялась в рамках ГП «Импортозамещающая фармпродукция», подпрограмма «Диагностикумы» (научные руководители темы: д-р хим. наук Н. М. Литвинко (ГНУ «Институт биоорганической химии», НАН Республики Беларусь) и проф., д-р мед. наук В. С. Камышников (ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»)).

Определить состояние антиоксидантной защиты организма пациентов при ОКС позволила разработанная в Беларуси тест-система «ОксиСтат» (руководитель разработки тест-системы проф., д-р хим. наук П. А. Киселев, ГНУ «Институт биоорганической химии», НАН Республики Беларусь).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программного пакета Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение. В ходе проведенной исследовательской работы было установлено, что концентрация ([С]) PAPP-A (рис. 1, 2) в сыворотке крови пациентов контрольной группы составила $6,56 \pm 0,25$ мМЕ/л (при использовании наборов реагентов фирмы PAPP-A «Roche») и $5,0 \pm 0,2$ мМЕ/л (при применении отечественной тест-системы PAPP-A «ЛИФМА»).

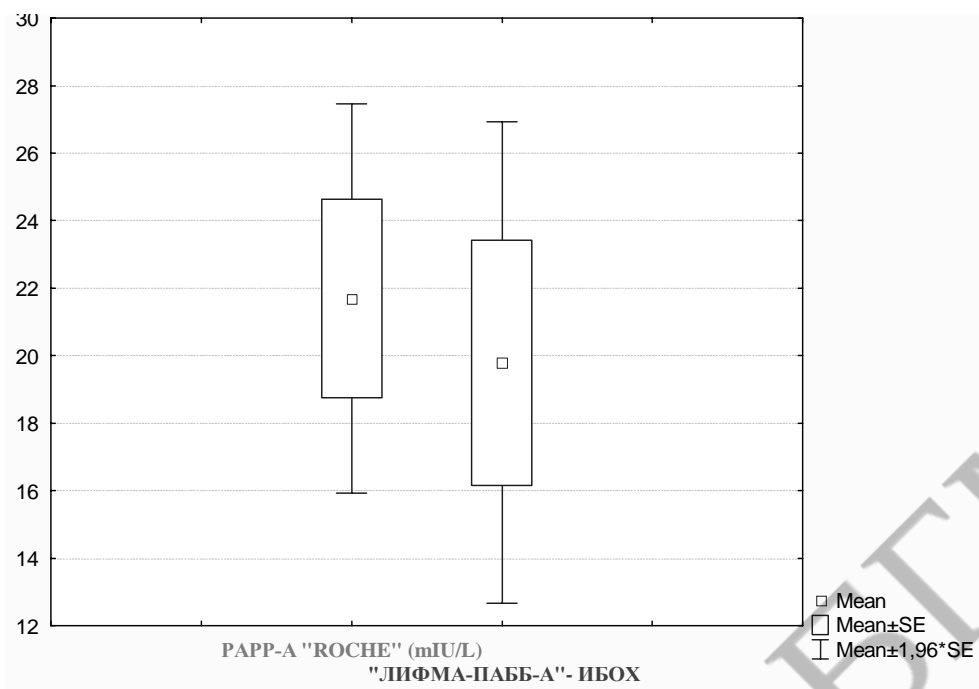


Рис. 1. Диаграмма размаха. Сравнение концентраций в сыворотке крови у пациентов с ОКС между РАРР-А «Roche», Швейцария и РАРР-А «ЛИФМА», Республика Беларусь

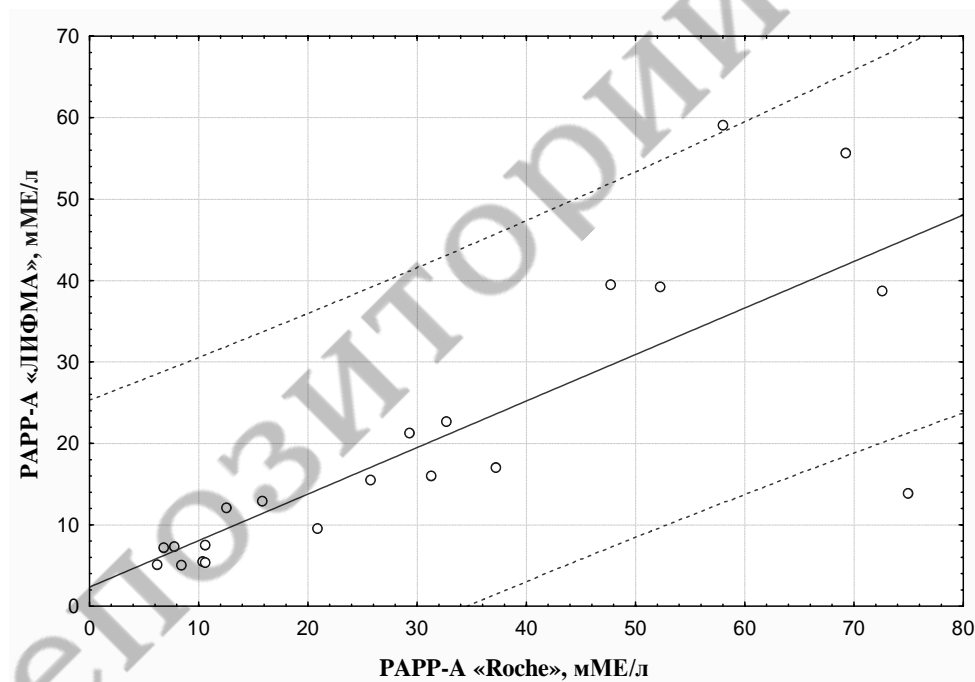


Рис. 2. Диаграмма рассеивания. Корреляция концентраций в сыворотке крови у пациентов с ОКС исследуемых биомаркеров

У исследуемых пациентов с верифицированным диагнозом «острый инфаркт миокарда» уровень РАРР-А составил $30,23 \pm 6,47$ мМЕ/л и $23,87 \pm 6,42$ мМЕ/л соответственно, что достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,0001$).

При нестабильной стенокардии концентрация этого специфического белка, определенная с применением двух видов наборов реагентов, составила $19,15 \pm 5,64$ мМЕ/л и $12,7$ мМЕ/л и была статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p < 0,0001$).

У пациентов, поступивших в кардиологические отделения клиники с установленным диагнозом «атеросклеротическая болезнь сердца», уровень PAPP-A в сыворотке крови составил: PAPP-A «Roche» = $11,63 \pm 1,86$ мМЕ/л, PAPP-A «ЛИФМА» = $13,77 \pm 4,09$ мМЕ/л, причем отмечается статистически значимое различие по сравнению данным показателем в контрольной группе ($p < 0,0001$).

Для подтверждения локального неспецифического воспаления при ОКС был использован набор реагентов фосфолипазы- A_2 — «ФЛА $_2$ -ФОА». В ходе исследований было установлено, что [С] ферментативной активности «ФЛА $_2$ -ФОА» в контрольной группе варьирует в пределах 0–2,2 МЕ/л ($X = 1,85 \pm 0,2$ МЕ/л), а уровень фосфолипазы- A_2 (ФЛА $_2$) в сыворотке крови у поступивших в стационар пациентов с ОКС значительно выше «нормы» — $3,95 \pm 0,34$ МЕ/л. Таким образом, концентрация ФЛА $_2$ в сыворотке крови у пациентов, страдающих острой коронарной патологией, оказалась почти в 2 раза выше, чем в группе «контроля».

При исследовании состояния эндогенной системы антиоксидантной защиты организма пациентов с ОКС (рис. 3) были установлены показатели ($0,97 \pm 0,04$ мкмоль/л) в 1,2 раза меньше, чем в группе «контроля» ($1,13 \pm 0,01$ мкмоль/л)

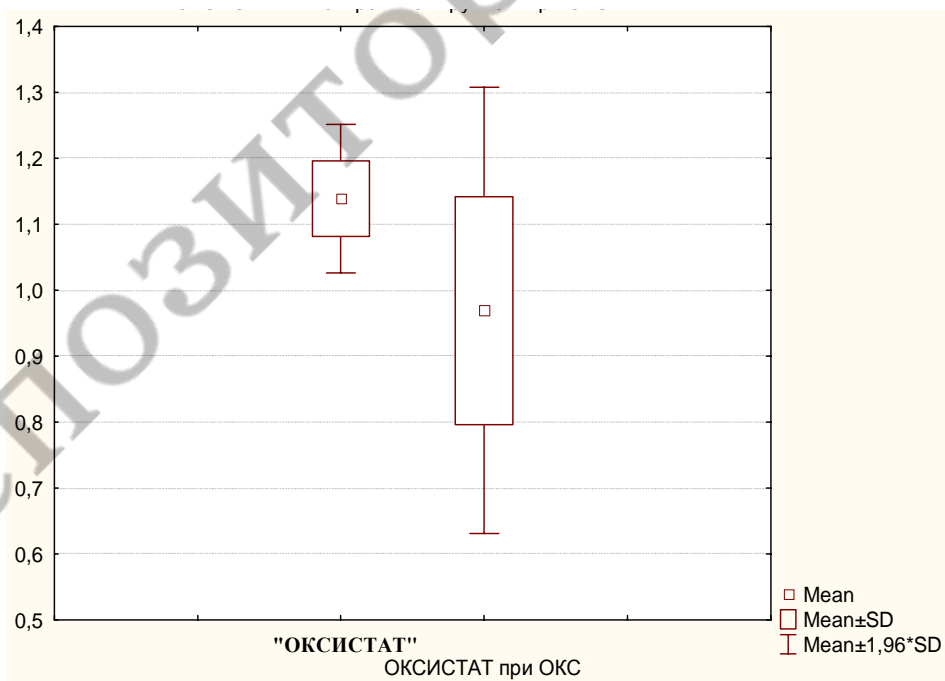


Рис. 3. Диаграмма размаха: Сравнение значений концентрации тест-системы «Оксистат» в контрольной группе и у пациентов с ОКС

Полученные данные свидетельствуют о снижении общей антиоксидантной активности сыворотки крови пациентов с острой коронарной патологией.

Заключение. Согласно полученным в ходе исследований результатам, «острый коронарный синдром» сопровождается изменением уровней концентраций в сыворотке крови пациентов всех изучаемых нами маркеров, как маркеров дестабилизации атеросклеротической бляшки (РАРР-А), так и маркеров неспецифического воспаления (ФЛА₂), а также изменением со стороны эндогенной системы антиоксидантной защиты организма. Если в первом случае происходит увеличение концентрации в сыворотке крови исследуемых веществ (РАРР-А и ФЛА₂), то во-втором («ОксиСтат») — снижение ферментативной активности у пациентов с ОКС.

Также продемонстрировано, что разработанные и апробированные ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» совместно с кафедрой клинической лабораторной диагностики (под руководством д-ра мед. наук, проф. В. С. Камышникова) и сотрудниками научно-исследовательской лаборатории (под руководством ст. науч. сотр. Т. М. Юрага) «Белорусской медицинской академии последипломного образования» наборы реагентов «ФЛА₂-ФОА» и «ОксиСтат» могут стать дополнительными тест-системами в определении степени воспаления и состояния антиоксидантной системы организма при острых формах коронарной патологии.

Благодаря разработкам отечественных ученых можно констатировать, что разработанный на базе ГНУ «Институтом биоорганической химии НАН Беларуси» набор реагентов РАРР-А «ЛИФМА» не уступает по основным характеристикам импортным аналогам и при последующем более детальном изучении может стать потенциальным предиктором ОКС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сердечно-сосудистые заболевания* // Центр СМИ ВОЗ. Информационный бюллетень № 317, январь 2015 г.
2. *Мрочек, А. Г.* Итоги работы кардиологической службы Республики Беларусь в 2016 г. и задачи на 2017 год : Республиканское совещание / А. Г. Мрочек.
3. *Камышников, В. С.* Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца (предикторы осложнений и мониторинг метаболических нарушений): учеб. пособие / В. С. Камышников, Л. И. Алехнович, А. Т. Кузьменко. Минск : Беларусь, 2015. С. 120–121.
4. *Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women* / M. G. Modena [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. 2002. Vol. 40. P. 505–555.
5. *Braunwald, E.* Unstable angina : an etiologic approach to management / E. Braunwald // Circulation. 1998. Vol. 98. P. 2219–22.
6. *Активность* эндогенной системы антиоксидантной защиты в процессе жизнедеятельности организма / М. А. Луцкий [и др.] // Успехи современного естествознания. 2014. № 12-1. С. 20–23.
7. *Яковлев-Малых, Н. Н.* Ассоциированный с беременностью протеин плазмы-А как новый биомаркер дестабилизации атеросклеротической бляшки при остром коро-

нарном синдроме / Н. Н. Яковлев-Малых, В. С. Камышников // Материалы VIII съезда врачей клиничко-лабораторной службы Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск, 10–11 ноября 2016. С. 171.

Innovative methods of detection of metabolic changes in complicated current of ischemic heart disease with using domestic technologies in clinical-laboratory practice

Yakovlev-Malykh N. N.

Modern studies in cardiology have achieved very significant successes in the diagnosis of individual forms of heart pathology. Particular importance in diagnostics is given to laboratory-diagnostic studies.

The search for predictors of a complicated course of coronary disease pathology is a priority for specialists engaged in research in this field.