

**Владимирский  
Владимир Евгеньевич**

**ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ И СЫВОРОТОЧНЫЕ МАРКЕРЫ АТЕРОГЕНЕЗА, ИХ  
ВЗАИМОСВЯЗЬ СО СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ  
МИОКАРДА И СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ, ЗНАЧИМОСТЬ ДЛЯ  
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА**

14.01.05- кардиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Пермь - 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – д.м.н., профессор И.П. Корюкина).

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней №1 ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России Мишланов Виталий Юрьевич.

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии имени В.Г. Вогралика ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академии» Минздрава России **Боровков Николай Николаевич;**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России **Загидуллин Шамиль Зарифович;**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии с курсом кардиологии и функциональной диагностики ФПК и ПП ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России **Максимов Николай Иванович.**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации; 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а.

Защита состоится 23.06.2015 на заседании диссертационного совета Д. 208.067.02 при ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России по адресу 614000 Пермь, ул. Петропавловская, 26.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России и сайтах [www.vak.ed.gov.ru](http://www.vak.ed.gov.ru) и [www.psma.ru](http://www.psma.ru).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Минаева Наталья Витальевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Значимость настоящего исследования обусловлена широкой распространенностью заболеваний, ассоциированных с атеросклерозом (Ferreira-González I., 2014, Goldman L., 2014). Можно говорить о наличии пандемии данной патологии в развитых странах мира, в том числе и в Российской Федерации (Оганов Р.Г., 2005; Национальные рекомендации по кардиоваскулярной профилактике, 2011; Шальнова С.А., 2011). Являясь основной причиной летальности и инвалидизации населения, ассоциированные с атеросклерозом заболевания наносят огромный экономический вред (Libby P., 2011; Roger V.L., 2012; Ferreira-González I., 2014; Воре Т., 2014). Ни одна из существующих концепций атерогенеза не дает ответов на все возникающие в ходе его изучения вопросов. В «фокусе» большинства современных концепций патогенеза атеросклеротического поражения сосудистой стенки значимая роль отводится лейкоцитам (Coller B., 2005; Ridker P.M., 2009; Koenig W., 2011; Libby P., 2012). Много усилий предпринято для выяснения роли моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов в атерогенезе от его начальных этапов и до развития тромботических осложнений (Hansson G.K., 2005). Напротив, роль полиморфноядерных нейтрофилов в развитии атеросклероза до недавнего времени изучалась недостаточно в связи с тем, что нейтрофильные инфильтраты редко обнаруживались в атеросклеротических бляшках по сравнению с другими воспалительными клетками (Weber C., 2008; Soehnlein O., 2009). Показано, что нейтрофилы в процессе атерогенеза проникают в артерии, где их непродолжительный срок службы продлевается воспалительными цитокинами. Это способствует дальнейшему прогрессированию воспаления и нестабильности бляшки (Maseri A., 2003; Weber C., 2008; Dragu R., 2008; Baetta.R., 2010; Hartaigh O., 2012). В настоящем исследовании предпринята попытка изучить роль нейтрофилов, продуцируемых ими факторов, а также ряда сывороточных «дополнительных» факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных гипертонической болезнью (ГБ), ишемической болезнью сердца (ИБС), облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК) и сочетанным течением атеросклероза. Актуальной исследовательской задачей явилось изучение динамики содержания белково-пептидных факторов в лейкоцитарных супернатантах у больных атеросклерозом в качестве маркеров эффективности проводимой терапии статинами с учетом их потенциальной способности модулировать функциональную активность нейтрофилов (Sugano R., 2005; van Oostrom A.J., 2006).

**Цель исследования:** на основе структурно-функционального исследования миокарда и артериальной стенки, новых лейкоцитарных и ряда сывороточных маркеров выявить факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных атеросклерозом различной локализации.

### **Задачи исследования.**

1. Провести клиническое обследование, изучить сывороточные и лейкоцитарные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных гипертонической болезнью, не имеющих клинических проявлений атеросклероза.
2. Выполнить клиническое обследование, изучить сывороточные и лейкоцитарные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных клинически манифестным атеросклерозом различных локализаций.
3. Оценить структурное состояние сосудистой стенки и взаимосвязи с сывороточными и лейкоцитарными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных атеросклеротическим поражением артерий различных бассейнов.
4. Изучить структурно-функциональное состояние сердца и взаимосвязи с сывороточными и лейкоцитарными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных ишемической болезнью сердца.
5. Экспериментально изучить белокпродуцирующую функцию, высвобождение нейтрофилами С-реактивного белка и предшественника мозгового натрийуретического пептида у больных стенокардией напряжения III функционального класса в условиях *in vitro*.
6. Оценить результаты математического моделирования в комплексной оценке белково-пептидного паттерна, выявлении клинической значимости изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных атеросклерозом различной локализации.
7. Изучить динамику сывороточных и лейкоцитарных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных атеросклерозом под влиянием комплексного лечения с применением статинов.

### **Научная новизна**

Впервые была разработана методика исследования содержания белков в лейкоцитарных супернатантах с помощью иммуноферментного анализа, которая позволила оценить конституциональные и индуцибельные белки, высвобождаемые нейтрофилами *in vitro*.

Впервые изучен белково-пептидный паттерн в лейкоцитарных супернатантах больных с различной локализацией и распространенностью атеросклероза. Определены различия в выявлении высоких концентраций изучаемых белков, характерные для больных ГБ, ИБС, ОААНК и сочетанным атеросклерозом. Показано, что у больных ГБ в лейкоцитарных супернатантах обнаруживаются высокие концентрации дефензинов-альфа и NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP), в то время, как величина липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВСЛ) не отличается от здоровых

лиц. Установлено, что в рамках сердечно-сосудистого континуума изменения белкового синтеза нейтрофилами наступают раньше, чем другие маркеры атерогенеза.

Определены «доминанты» белковой продукции в различных клинических ситуациях, так у больных ИБС в супернатантах обнаружена высокая концентрация широкого спектра молекул с превалированием дефензинов-альфа, NT-proBNP и фактора Виллебранда (ФВ), а у больных ОААНК – липопротеина (а) (ЛПа) и С-реактивного белка (СРБ). Показано высокое содержание СРБ в супернатантах в случае нестабильного характера атеросклеротических бляшек и проксимального типа поражения сосудистого русла у пациентов с ОААНК. Выявлено, что сочетанное течение атеросклероза наиболее часто ассоциировано с повышенным содержанием в супернатантах дефензинов-альфа, СРБ, ЛПа и ФВ.

Впервые при выполнении экспериментальной работы продемонстрирован факт роста концентрации NT-proBNP в процессе культивирования лейкоцитов больных ИБС, имеющих застойную сердечную недостаточность, что косвенно указывает на возможность продукции данного пептида нейтрофильными лейкоцитами.

Впервые проведено сравнительное изучение ЛВСЛ в группах больных доклиническим и клинически манифестным атеросклерозом различных локализаций. Показано, что максимальные значения этого показателя определяются у больных ИБС с нестабильной стенокардией и сочетанным течением атеросклероза, что подтверждает значимость этого показателя как маркера тяжести и активности атерогенеза. В пользу этого утверждения свидетельствует то, что имеется прямая взаимосвязь ЛВСЛ со средним процентом сужения коронарных артерий по данным ангиографии и обратная - со значением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ).

Выявлена взаимосвязь процессов атерогенеза, характеризуемых величиной ЛВСЛ, с клиническими (функциональный класс хронической сердечной недостаточности (ФК ХСН), определенный в модифицированном тесте 6 минутной ходьбы), биохимическими (сывороточное содержание NT-proBNP) и ультразвуковыми (размер левого предсердия (ЛП), конечный диастолический объем (КДО), тип ремоделирования) маркерами ХСН.

Установлено, что больных с доклиническим и клинически выраженным атеросклерозом характеризует высокое содержание в сыворотке дефензинов-альфа, что позволяет рассматривать их как маркер атерогенеза, интегрально отражающий напряженность воспалительной реакции.

Впервые показана взаимосвязь содержания дефензинов-альфа в сыворотке и супернатантах с показателями, отражающими структурные изменения сердца (КДО, конечный систолический объем (КСО), масса миокарда левого желудочка (ММЛЖ), фаза структурно-

функциональных изменений миокарда), что подтверждает общность процессов ремоделирования сердечно-сосудистой системы и воспаления в рамках сердечно-сосудистого континуума.

Впервые установлено снижение величины ЛВСЛ, концентраций СРБ и дефензинов-альфа в супернатантах на фоне комплексной терапии с включением статинов у больных с сочетанным течением атеросклероза. Этот факт позволяет говорить о дополнительных (плейотропных) эффектах терапии статинами в аспекте модулирования синтетической активности лейкоцитов.

В результате проведенных исследований и анализа научной литературы сформулирована **концепция дезадаптации механизмов воспаления и врожденного иммунитета в рамках сердечно-сосудистого континуума (ССК) у больных атеросклерозом различных локализаций**. В зависимости от фазы ССК установлена роль белковых факторов в процессе атерогенеза. Определены ранние и поздние маркеры этого процесса, позволяющие проводить дифференциальную диагностику и контролировать проводимую терапию.

#### **Практическая ценность**

Разработан способ оценки белокпродуцирующей функции нейтрофилов. Показана возможность использования этого метода для проведения клинических исследований.

Установлены новые дополнительные факторы риска и определены количественные значения этих показателей, свойственные больным атеросклерозом разных локализаций.

Предложены оптимальные алгоритмы обследования пациентов в различных клинических ситуациях.

В случае скрининга, проводимого у клинически здоровых лиц, для выявления ранних стадий атерогенеза целесообразно исследовать содержание дефензинов-альфа и NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах, а в сыворотке крови - концентрацию дефензинов-альфа. Превышение значений концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови более 1300 пг/мл, содержания в супернатантах дефензинов-альфа более 210000 пг/мл и NT-proBNP более 21 пг/мл определяет необходимость дополнительного обследования, верифицирующего наличие атеросклероза.

Для диагностики ИБС и уточнения показаний для инвазивных методов диагностики спектр рекомендованных исследований должен быть шире и включать определение величины ЛВСЛ, концентрации дефензинов-альфа, СРБ, ЛПА, VIIф, ФВ, NT-proBNP в супернатантах, а в сыворотке крови – дефензинов-альфа. При превышении значений величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л, концентрации дефензинов-альфа в супернатантах более 210000 пг/мл, СРБ более 25 мкг/л, ЛПА более 28 нг/мл, NT-proBNP более 21 пг/мл, ФВ более 0,07 ЕД/мл, VIIф более 0,64

нг/мл, в сыворотке – дефензинов-альфа более 1700 пг/мл рекомендуется выполнить исследования, верифицирующие наличие коронарного атеросклероза.

Для диагностики ОААНК спектр рекомендованного обследования следующий: определение содержания ЛПА и СРБ в лейкоцитарных супернатантах, дефензинов-альфа в сыворотке крови, а также величины ЛВСЛ. При превышении концентраций ЛПА в супернатантах более 35 нг/мл, СРБ - более 19,5 мкг/л, дефензинов-альфа в сыворотке - более 1300 пг/мл и величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л пациентам может быть предложено обследование, верифицирующее атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей.

У больных ОААНК установлено, что концентрация СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л ассоциирована с «нестабильным» характером атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий.

В клинической ситуации, когда имеется подозрение на наличие у пациента клиники нестабильной стенокардии оптимальным является изучение величины ЛВСЛ и концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови. При превышении значений величины ЛВСЛ более 0,18 ммоль/л и сывороточной концентрации дефензинов-альфа свыше 4000 пг/мл подобный диагноз является вероятным.

У больных с сочетанным течением атеросклероза показана эффективность терапии статинами, улучшающая как клинические исходы, так и модулирующая высвобождение липидов и ряда белков (СРБ и дефензины-альфа) лейкоцитами. Это подтверждает необходимость использования этих препаратов не только с целью улучшения липидного профиля, но и для непосредственного воздействия на процессы воспаления, опосредованного функциональной активностью лейкоцитов. Изучение содержания СРБ, дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах и ЛВСЛ может использоваться для контроля эффективности проводимой терапии.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Для больных атеросклерозом характерно увеличение содержания в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах молекул воспалительной, тромбофилической природы и других пептидов, с различными «доминантами» белковой продукции в зависимости от локализации и тяжести поражения.
2. Увеличение липидвысвобождающей способности лейкоцитов и нарушение белокпродуцирующей функции нейтрофилов являются значимым критерием тяжести и активности атерогенеза, отражают процессы сердечно-сосудистого континуума.

3. Установлена взаимосвязь сывороточных и лейкоцитарных факторов риска с клиническими проявлениями и структурно-функциональными изменениями сердца у больных коронарным атеросклерозом в сочетании с хронической сердечной недостаточностью.
4. Экспериментально установлено увеличение концентрации предшественника мозгового натрийуретического пептида в культурах лейкоцитов (нейтрофилов) по отношению к исходным значениям у больных ишемической болезнью сердца в сочетании с хронической сердечной недостаточностью.
5. У больных сочетанным течением атеросклероза комплексная терапия с включением статинов приводит к снижению величины ЛВСЛ, концентрации дефензинов – альфа и С-реактивного белка в супернатантах.

#### **Внедрение в практику**

Результаты исследования внедрены в практическую работу отделений ГАУЗ ПК ККБ №4 г. Перми, МЦ «Философия красоты и здоровья», ФЦССХ (г. Пермь). Теоретические положения используются в программах обучения на кафедре пропедевтики внутренних болезней №1 ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России. По результатам работы проведено патентование способа диагностики ФК ХСН (патент №2462175 от 28.02.2011) и способа оценки белоксинтезирующей функции лейкоцитов (патент №2530593 от 14.08.2014).

#### **Связь работы с научными программами**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России Номер регистрации 01.2.00305520. Работа выполнялась при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследования № 11-04-96021 конкурса Р\_урал\_а.

#### **Личный вклад соискателя в исследование**

При планировании, организации и проведения исследования по всем разделам работы доля личного участия автора составила не менее 90%. Автором самостоятельно обозначена актуальная научная проблема, спланирован дизайн, поставлена цель и задачи исследования. Выполнено общеклиническое обследование, создана компьютерная база данных, проведены статистическая обработка данных и анализ полученных результатов.

#### **Апробация работы, публикации**

Материалы диссертации доложены на IX Всероссийской научно–практической конференции «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении» (Санкт-Петербург, 2009); II Съезде терапевтов Юга России (Ростов-на-Дону, 2011), I съезде терапевтов Приволжского Федерального Округа (Пермь, 2011); XX



Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013); Respiratory Society Meeting (Bologna, Italy, 2013); Научно-практической конференции, посвященной 100-летию теории атеросклероза Н.Н. Аничкова (Санкт-Петербург, 2013); Иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013); XIII съезде кардиологов Юга России (Ростов-на-Дону, 2014).

Апробация работы проведена на расширенном заседании кафедр терапии ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России 04.03.2015 (протокол №4).

По теме диссертации опубликовано 25 работ, в том числе 12 статей в журналах, рекомендованных ВАК, имеются 2 патента РФ на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация представляет рукопись на русском языке объемом 231 страницы машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, обсуждения, выводов и практических рекомендаций. Указатель литературы содержит 284 источника, в том числе 24 отечественных и 260 иностранных. Диссертация иллюстрирована 82 таблицами, 4 схемами, 45 диаграммами и 1 протоколом исследования.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Планирование исследования.**

Для решения поставленной цели и задач исследования было запланировано сравнительное исследование. Формирование групп наблюдения проводилось методом последовательной рандомизации (Гринхальх Т., 2006). Предполагаемая мощность исследования по специальным методам обследования определена в диапазоне от 70 до 90 процентов (Моогс R., 1998; Чубенко А.В., 2004). Исходя из этого, по показателю ЛВСЛ предварительно определен размер выборки. Для мощности исследования 70%, минимальное количество пациентов должно было составить 19, а для достижения мощности 90% - 39 человек.

### **Дизайн исследования**

Всего обследовано 214 человек, из которых сформировано 4 группы наблюдения и 1 группа сравнения (схема 1). Первую группу обследования (1 группа) составили 66 больных ИБС в сочетании с ГБ, вторую – 52 пациента с ОААНК в сочетании с ГБ, третью - 38 больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ, четвертую - 25 больных ГБ без клинических и ультразвуковых признаков атеросклероза. Группу сравнения - 33 практически здоровых человека.

Из первой группы было выделено 2 подгруппы: 1а – пациенты со стабильной стенокардией напряжения (47 человек) и 1б - больные нестабильной стенокардией (19 человек).

Из числа больных 1а подгруппы было выделено 12 человек для проведения экспериментального исследования с лейкоцитарными культурами.

При ретроспективном наблюдении через 6 месяцев из больных третьей группы обследования выделены 2 подгруппы больных: 3а - пациенты с высокой комплаентностью к лечению, полностью получавшие комплексную терапию с включением статинов и 3б - пациенты с низкой комплаентностью к терапии, самостоятельно отказавшиеся от использования статинов.

Все группы наблюдения и сравнения были сопоставимы по возрастному и половому составу.

**Критериями включения** больных группы обследования были достоверные признаки соответствующих заболеваний (ИБС, ОААНК, атеросклероза сочетанного течения, ГБ), подтвержденные анамнезом (например, перенесенный ранее инфаркт миокарда (ИМ) или предпринятое оперативное лечение по поводу критической ишемии), ангиографией, дуплексным сканированием артерий.

**Критерии исключения** из исследования были следующие: острое сосудистое событие в течение последнего года; обострение или тяжелое течение любой сопутствующей патологии; сахарный диабет; активный воспалительный процесс.

#### **Методы обследования.**

##### **Общеклиническое обследование, тесты.**

Общеклиническое обследование включало сбор анамнеза, физическое обследование пациентов.

Для верификации тяжести ХСН применялся тест шестиминутной ходьбы в модифицированном варианте с on-line мониторингом частоты сердечных сокращений (ЧСС) (патент РФ №2462175 от 28.02.2011). Диагностирование ФК ХСН у больного ИБС осуществляли по установленным правилам (Национальные Рекомендации ВНОК и ОССН по диагностике и лечению сердечной недостаточности (IV пересмотр), 2012).

Тяжесть хронической артериальной недостаточности (ХАН) у больных ОААНК оценивалась по шкале Фонтейна-Покровского (Покровский А.В., 2004), которая предполагает оценку дистанции безболевой ходьбы (ДБХ), физическое обследование нижних конечностей и оценку лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ).

##### **Лабораторные исследования.**

Всем пациентам групп обследования проводился общий анализ крови (ОАК). Оценивались следующие биохимические показатели крови: креатинин крови, мкМоль/л с

расчетом СКФ по формуле СКД EPI, мл/мин; холестерин, ммоль/л; липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), ммоль/л; триглицериды (ТГ), ммоль/л; липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), ммоль/л; индекс атерогенности (ИА); липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л. Проводилось изучение следующих показателей коагулограммы: активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), сек; протромбинового времени (ПТВ), сек; концентрации фибриногена, г/л; растворимых фибрин мономерных комплексов (РФМК), мг/дл; аденозин дифосфат (АДФ) индуцированной агрегации тромбоцитов; хагеманзависимого фибринолиза (ХЗФ), мин.

#### **Инструментальное обследование.**

##### ***Ультразвуковые методы (УЗ) исследования сердца и сосудов.***

Для работы использовался УЗ сканер экспертного класса VIVID 7 Pro/ VIVID 7 VT-03 Vantage. На основании ультразвукового исследования сердца (УЗИ) определялось: отсутствие морфо-функциональных изменений, бессимптомная дисфункция ЛЖ, адаптивное и дезадаптивное ремоделирование сердца (Национальные Рекомендации ВНОК и ОССН по диагностике и лечению сердечной недостаточности (IV пересмотр), 2012).

Проводились дуплексное сканирование (ДС) и УЗ доплерография (ДГ) артерий брахиоцефальных и нижних конечностей. Оценивали толщину комплекса интима- медиа (ТИМ), наличие или отсутствие атеросклеротических бляшек, их структуру, определяли степень стеноза и особенности строения сосудов. В режиме ДГ определялась линейная скорость кровотока (ЛСК), оценивался ЛПИ.

##### ***Ангиографические исследования.***

Пациентам групп 1 и 3 по показаниям выполнялась коронарная ангиография (КАГ), а больным 2 группы - брюшная аортография. В ходе этих исследований оценивалось сужение артерий (%), особенности кровотока.



Схема 1. Дизайн исследования

### **Специальные методы исследования.**

Пациентам групп наблюдения и сравнения проводилось специальное обследование, включающее исследование лейкоцитарных культур.

Посредством иммуноферментного анализа (ИФА) изучалась сывороточная концентрация СРБ, ЛПа, NT-proBNP, VIIф, дефензинов альфа (1-3), белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК), интерлейкина 6 (ИЛ-6), интерлейкина 8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа). Всем пациентам определялась ЛВСЛ по методике А.В. Туева и В.Ю. Мишланова (патент РФ № 2194995, 2002 г.).

Для решения цели и задач исследования специально разработан метод определения содержания белков путем проведения ИФА лейкоцитарных супернатантов (патент РФ № 2530593 от 14.08.2014 г.).

Способ осуществляют следующим образом. Лейкоциты выделяют из венозной крови с помощью системы Vacutainer BD, содержащей декстрозу или методом отстаивания в растворе полиглюкина. Клеточную суспензию отмывают физиологическим раствором натрия хлорида, затем питательной средой Игла-МЕМ. Осуществляют подсчет количества клеток и доводят их концентрацию до 50000 в 1 мкл, что обеспечивает тесный клеточный контакт при культивировании лейкоцитов. Суспензию лейкоцитов в количестве 400 мкл помещают в стерильные пенициллиновые флаконы, закрывают резиновыми пробками. Культивирование клеточной суспензии, обогащенной лейкоцитами, осуществляется в среде Игла-МЕМ в течение 72 часов при 37 °С. Затем молекулярную диагностику осуществляют методом ИФА. В супернатантах изучалось содержание СРБ, ЛПа, дефензинов альфа (1-3), VIIф, NT-proBNP, ФВ.

### **Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка результатов производилась при помощи программного пакета Статистика 8.0. При выявлении закона распределения соблюдался следующий порядок: подготовка опытных данных; построение гистограмм (полигонов) количественных характеристик; проверка допустимости предполагаемого закона распределения, используя определенные критерии согласия (Пирсона, Колмогорова и др.). Подготовка опытных данных включала выборку исходных результатов из медицинских документов, составление вариационного ряда и заполнение таблицы. Далее проводилось определение *ошибки выборки*. Для среднего значения определяли *предельную ошибку выборки*. Грубые ошибки и промахи обнаруживали и исключали из расчетов. По

большинству показателей распределение имело экспоненциальный или усеченный нормальный характер. Количественные признаки представлялись в виде - средняя (M), percentile 10%, percentile 90%. Оценка статистической значимости отличий признаков независимых друг от друга группировок проводилось по критерию Манна-Уитни. Оценка значимости отличий признаков зависимых группировок проводилось по критерию Вилкоксона. Для определения наличия связи между признаками использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Связь между значениями оценивалась как сильная при  $R > 0,7$ , средней силы при  $R$  от 0,3 до 0,7, слабая при  $R$  менее 0,3. Точность и эффективность диагностических тестов определялась путем построения ROC-кривых (Receiver Operator Characteristic) (Fawcett T., 2004). На осях откладывались чувствительность (Sensitivity) и 100-Специфичность (Specificity). Для интерпретации использовался показатель AUC (Area Under Curve) - площадь под кривой. По показателю AUC определялось качество модели: 0,9-1,0 - отличное; 0,8-0,9 - очень хорошее; 0,7-0,8 - хорошее, 0,6-0,7 - среднее; 0,5-0,6 - неудовлетворительное; ниже 0,5 показатель совсем не характеризует разделение на группы. Для ранжирования полученных отличий использовался принцип Парето с построением диаграммы. Диаграмма Парето представляет собой столбчатую диаграмму, по горизонтальной оси которой откладываются наименования анализируемых факторов в определенном порядке, а по вертикальной – значения каждого из факторов в безразмерных единицах (%). Для оценки дифференциально-диагностической значимости паттерна изучаемых факторов применялся *метод логистической регрессии* (Zweig M.H.,1993). В последующем использовался ROC анализ для оценки диагностической эффективности полученной математической модели, комплексно характеризующей изучаемые показатели. Для показателей, включенных в уравнение регрессии, определялся средний процент отклика на 1% увеличения их значений.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Результаты исследования больных гипертонической болезнью без клинических и ультразвуковых признаков атеросклероза**

Группу больных ГБ составили 25 пациентов среднего возраста  $56,5 \pm 6,87$  (SD) лет (percentile 10% - 47, percentile 90% - 65). В данной группе преобладали мужчины (77%), курящие табак (59%), лица с отягощенным семейным анамнезом по атеросклерозу (67%).

Структура тяжести ХСН у пациентов этой группы была следующей: 32% не имели признаков ХСН, 36% - I ФК ХСН и 32% - II ФК ХСН.

Среди пациентов с ГБ 86% не имели морфо-функциональных нарушений сердца, а 14% соответствовали критериям бессимптомной дисфункции миокарда (БДМ). При этом средние значения УЗ показателей были в нормативной зоне. Проведенный корреляционный анализ выявил обратную сильную взаимосвязь ФК ХСН (по данным теста 6 минутной ходьбы с on-line мониторингом ЧСС) с фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) ( $R=-0,7$ ,  $p=0,04$ ) и прямую умеренной силы с толщиной межжелудочковой перегородки (МЖП) ( $R=0,5$ ,  $p=0,03$ ).

Всем пациентам с ГБ была выполнена специальная часть исследования. Проведено сравнение полученных результатов с данными здоровых лиц (таблица 1). Результаты сравнительного анализа показали, что у больных ГБ достоверно выше содержание в сыворотке ЛПА и дефензинов-альфа, что свидетельствует о тромбофилии и напряжении противомикробной защиты у данной категории пациентов. При этом в лейкоцитарных супернатантах пациентов с ГБ выявлялась значимо более высокая концентрация NT-proBNP и дефензинов-альфа, чем у здоровых, что может указывать на изменение способности лейкоцитов к высвобождению факторов противомикробной защиты и протективных молекул.

Проведена оценка разделительной эффективности полученных различий между группами больных ГБ и практически здоровых лиц путем проведения ROC анализа (см. диаграмму 1). Анализ значения AUC показал, что точками разделения между здоровыми и больными ГБ являются концентрации в сыворотке крови дефензинов-альфа более 1300 пг/мл (отличные операционные характеристики,  $AUC=1$ ) и ИЛ-8 более 3,39 пг/мл (средние операционные характеристики,  $AUC=0,66$ ), а в лейкоцитарных супернатантах содержание NT-proBNP, превышающее 21 пг/мл (очень хорошие операционные характеристики,  $AUC=0,84$ ) и дефензинов-альфа – более 210000 пг/мл (хорошие операционные характеристики,  $AUC=0,72$ ), при этом значение ЛВСЛ выше 0,15 ммоль/л имело неудовлетворительные разделительные свойства ( $AUC=0,52$ ).

В группе больных ГБ по точкам разделения этих показателей была построена диаграмма Парето, показавшая, что содержание в сыворотке крови дефензинов-альфа в 100% случаев превышало полученную выше точку разделения, ИЛ-8 – в 59%, концентрация в лейкоцитарных супернатантах NT-proBNP - в 84%, дефензинов-альфа - в 50%, а значение ЛВСЛ только в 32% случаев (диаграмма 1). Данные результаты свидетельствуют о том, что у пациентов с доклинической стадией атеросклероза преобладают провоспалительные процессы и изменение белокпродуцирующей функции лейкоцитов предшествует активации ЛВСЛ.

Таблица 1

Статистическая достоверность различий изучаемых биомаркеров у больных ГБ без клинических проявлений атеросклероза и здоровых лиц (статистика U Манна-Уитни)

Показатель	Группа больных ГБ Median (percentile 10/90), (n=25)	Здоровые лица Median (percentile 10/90), (n=33)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,12(0,07/0,16)	0,13(0,1/0,15)	0,67
СРБ в сыворотке, мг/л	4,12 (1,66/15,25)	2,30 (0,22/2,3)	1,00
СРБ в супернатанте, мкг/л	55,9 (18,3/130)	18,34 (1,7/32,6)	1,00
ЛПв в сыворотке, нг/мл	39,89 (22,05/68,75)	8,68 (5,66/8,68)	<b>0,04</b>
ЛПв в супернатанте, нг/мл	52,19(32,5/84,00)	25,60 (13,53/45,85)	1,00
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	4,93(2,53/7,28)	1,92 (0,8/1,92)	1,00
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	2,37(0,78/4,74)	0,26 (0/0,51)	1,00
NT-проBNP в сыворотке, пг/мл	142,33 (10,00/151,50)	39,38(0/120,35)	0,16
NT-проBNP в супернатанте, пг/мл	138,14 (47,46/277,98)	18,25 (0/35,39)	<b>0,03</b>
Дефензины в сыворотке, пг/мл	6577,54 (3390,80/11296,00)	626,37 (270,40/1376,00)	<b>0,01</b>
Дефензины в супернатанте, пг/мл	518428,6 (109300,00/863000,00)	117206,1(11420/200000)	<b>0,05</b>
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	2,48 (0,11/7,30)	1,04 (0,8/1,5)	0,16
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	8,52 (0/27,3)	5,34 (0/24,4)	0,06

Для комплексной оценки значимости различий паттерна белково-пептидных факторов больных ГБ и здоровых лиц выбраны: концентрация в супернатантах NT-проBNP, а также сывороточное содержание дефензинов-альфа. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии:  $y = -22,625 + 0,1031112 * x_1 + 0,004459916 * x_2$ , где  $x_1$  - концентрация NT-проBNP в супернатантах,  $x_2$  - сывороточная концентрация дефензинов-альфа (p(правдоподобия)=0,0001). Данная двухкомпонентная модель имела отличную статистическую значимость по результатам проведенного ROC анализа (AUC-0,99) (диаграмма 2).

Для показателей, включенных в построенную модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение концентрации NT-проBNP в лейкоцитарных супернатантах и дефензинов-альфа в сыворотке крови на 1% приводит к росту значения  $\gamma$  на 0,24% и 0,76% соответственно.



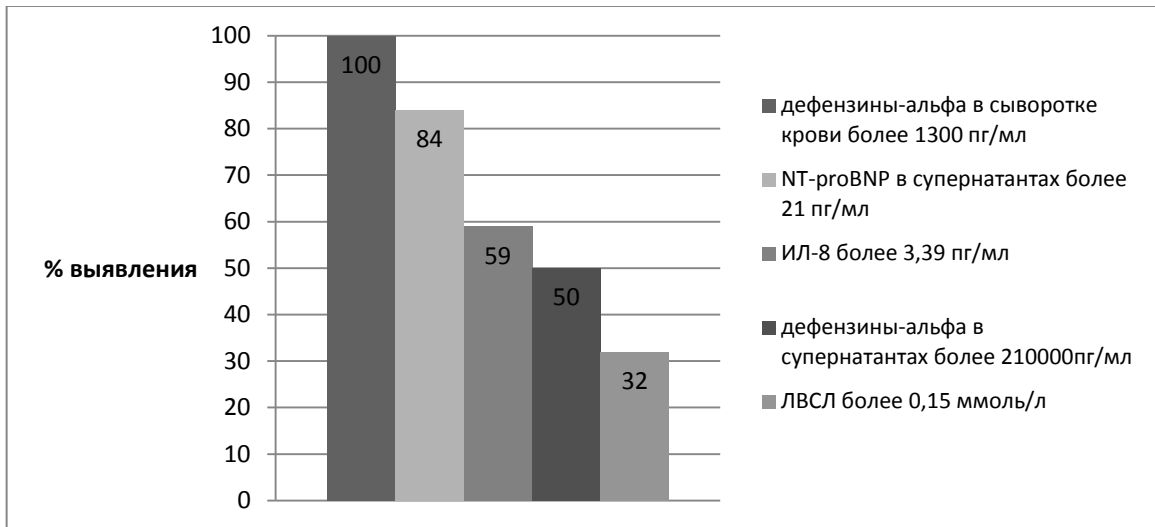


Диаграмма 1. Диаграмма Парето, построенная по частоте выявления высоких значений сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ГБ

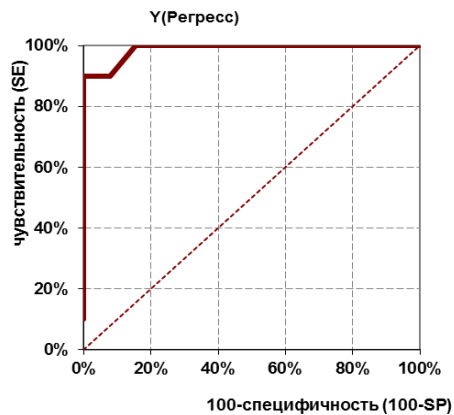


Диаграмма 2. ROC кривая, построенная по значению  $\gamma$  у больных ГБ

В результате корреляционного анализа выявлено, что в группе больных ГБ концентрации дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах и ФНО-альфа в сыворотке имеют сильную прямую связь ( $R=0,72$ ,  $p=0,02$ ).

Оценка взаимосвязи изучаемых показателей с УЗ параметрами сердца показала, что значение величины ЛВСЛ имеет умеренной силы прямую связь с размерами левых отделов сердца - конечно-диастолическим объемом (КДО) ( $R=0,48$ ,  $p=0,02$ ) и линейным размером левого предсердия (ЛП) ( $R=0,94$ ,  $p=0,03$ ); концентрация СРБ ( $R=0,82$ ,  $p=0,02$ ) и ИЛ-6 ( $R=0,46$ ,  $p=0,045$ ) в сыворотке - прямую связь со средней толщиной стенки левого желудочка (ЛЖ), а содержание ИЛ-6 в сыворотке крови и ФВ ЛЖ - умеренной силы обратную связь ( $R=-0,49$ ,  $p=0,02$ ).

Определена прямая сильная связь концентрации холестерина крови и ЛВСЛ ( $R=0,78$ ,  $p=0,02$ ), содержания в супернатантах СРБ и ТГ в сыворотке крови ( $R=0,78$ ,

$p=0,04$ ), концентрации NT-proBNP в супернатантах и ЛПВП в сыворотке крови ( $R=0,8, p=0,02$ ).

Таким образом, у больных ГБ в сравнении со здоровыми лицами отмечались более высокие концентрации дефенинов-альфа и ИЛ-8 в сыворотке крови, а в лейкоцитарных супернатантах – дефенинов-альфа и NT-proBNP. Величина ЛВСЛ у больных с доклинической стадией атеросклеротического поражения значимо не отличалась от таковых здоровых лиц, что указывает на более раннее изменение белокпродуцирующей функции лейкоцитов, чем способности последних высвобождать белково-липидные комплексы. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация дефенинов-альфа в сыворотке и NT-proBNP в супернатантах) для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн, характерный для больных ГБ. Выявлена взаимосвязь величины ЛВСЛ, концентрации в супернатантах ряда белковых факторов (СРБ и NT-proBNP) и «традиционных» показателей липидного спектра.

#### **Результаты исследования в общей группе больных ишемической болезнью сердца в сочетании с гипертонической болезнью**

В эту группу было включено 66 больных ИБС со стабильной и нестабильной стенокардией среднего возраста  $60,2 \pm 8,9$  (SD) лет (percentile 10% - 50, percentile 90% - 70). Среди обследованных этой группы преобладали мужчины (75%), курящие табак (72%), лица с отягощенным семейным анамнезом (62%).

Структура тяжести ХСН у пациентов этой группы была следующей: 6% имели I ФК ХСН, 45% - II ФК ХСН, 48% - III ФК ХСН и 1% - IV ФК ХСН.

Анализ средних значений показателей УЗИ сердца позволяет констатировать наличие у больных ИБС признаков гипертрофии миокарда левого желудочка (среднее значение индекса массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) - 134 (P10%-99, P90%184),  $г/м^2$ ) и незначительного повышения давления в легочной артерии (среднее давление в легочной артерии (СДЛА) – 23 (P10%-10, P90%-38), мм рт ст), характеризующего застой крови в малом круге кровообращения. У большинства обследуемых с ИБС отмечалась БДМ (47%), дезадаптивное ремоделирование миокарда (ДРМ) отмечено только у 9% пациентов. Установлена слабая прямая связь ФК ХСН с линейными размерами ЛП ( $R=0,3, p=0,02$ ), КДО ЛЖ ( $R=0,2, p=0,03$ ), размером правого желудочка ( $R=0,3, p=0,01$ ), СДЛА ( $R=0,3, p=0,04$ ), тяжестью ремоделирования ЛЖ ( $R=0,3, p=0,45$ ), умеренной силы прямая связь с конечным систолическим объемом (КСО) ЛЖ

( $R=0,45$ ,  $p=0,03$ ), а также умеренной силы обратная связь с ФВ ЛЖ ( $R=-0,4$ ,  $p=0,04$ ). Анализ результатов ангиографического исследования коронарных сосудов выявил у большинства больных признаки стенозирующего многососудистого поражения. Однако ни ФК стенокардии напряжения, ни ФК ХСН с выраженностью стеноза и количеством пораженных артерий достоверно не коррелировали, что можно связать с компенсаторной адаптацией коронарного кровотока к меняющимся условиям работы сердца.

Результаты исследования концентраций изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов представлены в таблице 2. Показано, что содержание всех изучаемых показателей в сыворотке и супернатантах было выше у больных ИБС, чем у практически здоровых лиц. Проведена оценка разделительной эффективности полученных различий содержания биомаркеров у больных ИБС и здоровых лиц посредством ROC анализа. Анализ значения AUC показал, что у больных ИБС концентрации дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах выше 210000 пг/мл ( $AUC=0,98$ ), NT-proBNP - более 21 пг/мл ( $AUC=0,93$ ), ФВ - свыше 0,07 ЕД/мл ( $AUC=1$ ), VIIф - более 0,64 нг/мл ( $AUC=0,98$ ) имеют отличную разделительную (от здоровых лиц) эффективность; СРБ более 25,33 мкг/л ( $AUC=0,75$ ) – очень хорошую, а ЛПА свыше 28,23 нг/мл ( $AUC=0,82$ ) - хорошую. Содержание дефензинов-альфа в сыворотке крови более 1700 пг/мл ( $AUC=1$ ), СРБ - более 3,91 мг/л ( $AUC=0,94$ ) и VIIф – выше 2,22 нг/мл ( $AUC=0,99$ ) рассматриваются как отличные разделительные критерии между больными ИБС и здоровыми лицами; концентрации NT-proBNP более 23,87 пг/мл ( $AUC=0,8$ ) и ИЛ-6 свыше 1,72 пг/мл ( $AUC=0,89$ ) - как очень хороший, а ИЛ-8 более 4,89 пг/мл ( $AUC=0,69$ ) – как средний показатель. Для величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л ( $AUC=0,71$ ) установлены средние операционные характеристики. По полученным точкам разделения построена диаграмма Парето (диаграмма 3), из которой видно, что у больных ИБС наиболее часто отмечаются высокие концентрации дефензинов-альфа, ФВ, VIIф и NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах.

Для оптимальной комплексной сравнительной оценки белково-пептидного паттерна в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах больных ИБС и здоровых лиц выбраны: концентрации VIIф, NT-proBNP, дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах; в сыворотке крови – VIIф, СРБ и дефензинов-альфа, а также величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение:  $y=-26,99+0,155*x_1+0,277*x_2+0,0192491*x_3+0,000425268*x_4+0,000021356*x_5+1,61251*x_6+3,62402*x_7$ , где  $x_1$ - величина ЛВСЛ,  $x_2$ - концентрация VIIф в супернатантах,  $x_3$ - концентрация NT-proBNP в супернатантах,  $x_4$ - концентрация

дефензинов-альфа в сыворотке крови, x5- концентрация дефензинов-альфа в супернатантах, x6- сывороточная концентрация СРБ, x7- концентрация VIIф в сыворотке крови ( $p(\text{правдоподобия})=0,0001$ ). Для оценки разделительной (от здоровых лиц) значимости данной математической модели, характеризующей белково-пептидный паттерн у больных ИБС, проведен ROC анализ. Данная модель по показателю AUC имеет отличные разделительные свойства (диаграмму 4)

Таблица 2

**Статистическая значимость различий между группой больных ИБС в сочетании с ГБ и здоровых лиц (статистика U Манна-Уитни)**

Показатель	Группа больных ИБС в сочетании с ГБ Median (percentile 10/90), (n=66)	Здоровые лица Median (percentile 10/90), (n=33)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,17 (0,09/0,25)	0,13(0,1/0,15)	<b>0,001</b>
СРБ в сыворотке, мг/л	6,87 (1,68/11,49)	2,30 (0,22/2,3)	<b>0,001</b>
СРБ в супернатанте, мкг/л	42,79 (10,4/91,2)	18,34 (1,7/32,6)	<b>0,001</b>
ЛПА в сыворотке, нг/мл	40,51 (29,5/40,4)	8,68 (5,66/8,68)	<b>0,001</b>
ЛПА в супернатанте, нг/мл	39,86 (25,3/56,3)	25,60 (13,53/45,85)	<b>0,001</b>
ФВ в супернатанте, ЕД/мл	1,10 (0,87/1,37)	0,04(0,01,0,05)	<b>0,001</b>
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	5,24 (2,79/8,63)	1,92 (0,8/1,92)	<b>0,001</b>
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	2,02 (0,52/4,1)	0,26 (0/0,51)	<b>0,001</b>
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	424,97 (29/1714)	39,38(0/120,35)	<b>0,001</b>
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	127,07 (11,05/222,89)	18,25 (0/35,39)	<b>0,001</b>
Дефензины в сыворотке, пг/мл	4928,25(1864/8192)	626,37 (270,40/1376,00)	<b>0,001</b>
дефензины в супернатанте, пг/мл	654610,00(200000/949000)	117206,1(11420/200000)	<b>0,001</b>
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	12,70 (1,1/44,57)	1,04 (0,8/1,5)	<b>0,001</b>
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	39,25 (0/136,9)	5,34 (0/24,4)	<b>0,02</b>

Для показателей, включенных в построенную модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение содержания NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах на 1% приводит к росту значения  $\gamma$  на 0,04%, дефензинов-альфа – на 0,45% и VIIф - на 0,01%. Показано, что прирост концентрации СРБ в сыворотке крови на 1% приводит к увеличению значения  $\gamma$  на 0,12%, дефензинов-альфа – на 0,04% и VIIф - на 0,34%, а величины ЛВСЛ – на 0,01%.

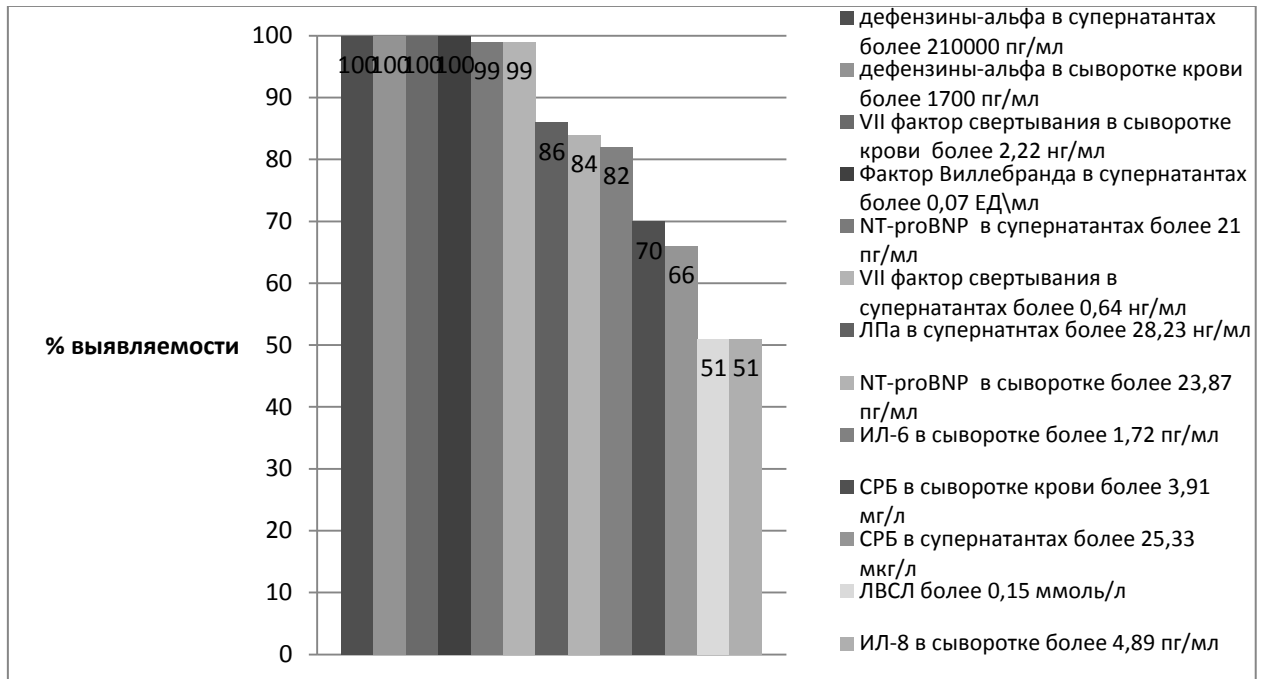


Диаграмма 3. Диаграмма Парето, построенная по частоте выявления высоких значений сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ИБС в сочетании с ГБ

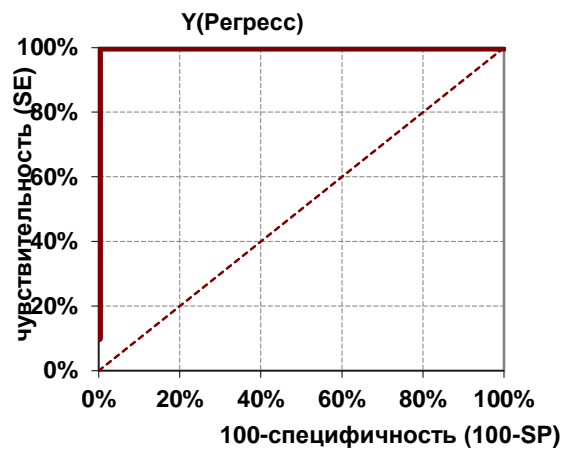


Диаграмма 4. ROC кривая, построенная по значению  $\gamma$  у больных ИБС в сочетании с ГБ

Величина ЛВСЛ имеет прямую умеренной силы связь с содержанием в сыворотке NT-proBNP ( $R=0,32$ ,  $p=0,04$ ), КДО ЛЖ ( $R=0,34$ ,  $p=0,01$ ), СДЛА ( $R=0,46$ ,  $p=0,02$ ), тяжестью структурно-функциональных изменений сердца ( $R=0,31$ ,  $p=0,03$ ), также выявлена отрицательная зависимость с ФВ ЛЖ ( $R=-0,35$ ,  $p=0,008$ ). Связь содержания в лейкоцитарных супернатантах СРБ и дефензинов-альфа ( $R=0,37$ ,  $p=0,04$ ), а также дефензинов-альфа и NT-proBNP ( $R=0,4$ ,  $p=0,03$ ) носила умеренной силы прямой характер. Была выявлена взаимосвязь между содержанием дефензинов-альфа в сыворотке крови и КДО ЛЖ ( $R=0,57$ ,  $p=0,01$ ), тяжестью ремоделирования сердца ( $R=0,43$ ,  $p=0,02$ ), а также

сывороточной концентрацией ИЛ-6 ( $R=0,47$ ,  $p=0,009$ ) Содержание дефенинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах имело сильную прямую связь с размерами ЛП ( $R=0,8$ ,  $p=0,03$ ), ММЛЖ ( $R=0,8$ ,  $p=0,008$ ), концентрацией NT-proBNP в супернатантах ( $R=0,4$ ,  $p=0,03$ ). Концентрация ЛПа в лейкоцитарных супернатантах и КДО ЛЖ были связаны прямой связью умеренной силы ( $R=0,43$ ,  $p=0,02$ ). Содержание СРБ в супернатантах прямо коррелировало с содержанием в них дефенинов-альфа ( $R=0,37$ ,  $p=0,04$ ) и линейным размером ЛП ( $R=0,82$ ,  $p=0,02$ ). Установлено, что, чем выше содержание ИЛ-6, тем больше размер ЛП ( $R=0,81$ ,  $p=0,02$ ), тяжелее структурно-функциональное ремоделирование сердца ( $R=0,32$ ,  $p=0,03$ ) и ниже ФВ ЛЖ ( $R=-0,44$ ,  $p=0,03$ ).

Анализ взаимосвязи изученных сывороточных и лейкоцитарных маркеров с «традиционными» липидными факторами риска установил прямую умеренной силы корреляцию между содержанием СРБ в супернатантах и ЛПОНП ( $R=0,64$ ,  $p=0,03$ ), а в сыворотке крови между VIIф и ЛПНП ( $R=0,37$ ,  $p=0,04$ ). Более слабая связь показателей липидного спектра с изученными сывороточными и лейкоцитарными факторами в группе больных ИБС, в сравнении с группой пациентов с ГБ, объясняется тем, что только 12% пациентов с ГБ применяли статины, а в группе больных ИБС 88% получали подобную терапию.

Таким образом, у больных ИБС выявлено, что, в сравнении со здоровыми лицами, в сыворотке значимо выше концентрация СРБ, ЛПа, дефенинов-альфа, VIIф, NT-proBNP, ФВ, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-альфа, а в супернатантах лейкоцитарных культур выше содержание дефенинов-альфа, СРБ, ЛПа, VIIф, ФВ и NT-proBNP. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация дефенинов-альфа, СРБ и VIIф в сыворотке и дефенинов-альфа, NT-proBNP, VIIф в супернатантах, а также величина ЛВСЛ) для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн, характерный для больных ИБС (AUC-1). У больных ИБС выявлена прямая взаимосвязь величины ЛВСЛ с суррогатными маркерами ХСН (размеры ЛЖ, сывороточное содержание NT-proBNP, тип ремоделирования сердца). В группе больных ИБС содержание дефенинов-альфа и ЛПа в сыворотке и супернатантах прямо коррелировало с размерами левого желудочка, а сывороточная концентрация ИЛ-6 была прямо взаимосвязана с размерами ЛП и обратно - с ФВ ЛЖ.

### **Результаты обследования больных ишемической болезнью сердца стабильного течения в сочетании с гипертонической болезнью**

Эту подгруппу составили 47 больных среднего возраста  $60,1 \pm 9,5$  (SD) лет (percentile 10% - 48, percentile 90% - 71). Среди обследуемых преобладали мужчины (78%), курящие табак (76%), лица с отягощенным семейным анамнезом по атеросклерозу (65%). Распределение больных по ФК стенокардии напряжения было следующим: у 18% отмечался II ФК и 82% - III ФК. Структура тяжести ХСН у пациентов этой подгруппы почти полностью соответствовала общей группе больных ИБС: 4% имели I ФК ХСН, 45% - II ФК ХСН, 50% - III ФК ХСН и 1% - IV ФК ХСН.

Анализ средних значений параметров УЗИ сердца позволяет констатировать наличие у пациентов данной группы признаков дилатации ЛП ( $40$  (P10%-32, P90%-47), мм), снижения ФВ ЛЖ ( $53$  (P10%-44, P90%-63), %), гипертрофии левого желудочка (ИММЛЖ -  $134$  (P10%-100, P90%-182), г/м<sup>2</sup>), а также умеренного повышения давления в системе легочной артерии (СДЛА -  $23$  (P10%-10, P90%-37), мм рт ст). При этом у 21% пациентов не выявлено структурно-функциональных повреждений сердца, у 50% отмечались признаки БДМ, у 21% - адаптивного ремоделирования миокарда (АРМ) и у 8% - ДРМ. Была проведена оценка корреляций показателей УЗИ сердца и ФК ХСН по данным модифицированного теста 6 минутной ходьбы. Выявлена прямая умеренной силы связь ФК ХСН с тяжестью морфо-функционального ремоделирования сердца ( $R=0,33$ ,  $p=0,04$ ), КСО ЛЖ ( $R=0,45$ ,  $p=0,03$ ) и обратная связь с ФВ ЛЖ ( $R=-0,43$ ,  $p=0,01$ ).

Результаты ангиографического исследования коронарных артерий свидетельствуют о наличии у больных этой группы многососудистого стенозирующего поражения артерий. Взаимосвязи тяжести поражения коронарного русла с ФК ХСН и ФК стенокардии напряжения не отмечено.

Было произведено сравнение результатов специального обследования больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ с данными, полученными у пациентов с ГБ. Показано, что величина ЛВСЛ, концентрации дефензинов-альфа в супернатантах, а в сыворотке NT-proBNP, ИЛ-6 и ФНО-альфа достоверно выше у больных ИБС стабильного течения (таблица 3). Определены точки разделения по изучаемым показателям между больными ИБС со стабильной стенокардией напряжения и ГБ путем построения ROC кривых. Значение концентрации дефензинов-альфа в супернатанте - более  $300214$  пг/мл ( $AUC=0,7$ ), ИЛ-6 в сыворотке крови - более  $2,58$  пг/мл ( $AUC=0,76$ ) и величины ЛВСЛ - более  $0,15$  ммоль/л ( $AUC=0,71$ ) являются хорошими разделительными

критериями между больными ИБС стабильного течения и ГБ, а содержание ФНО-альфа в сыворотке крови свыше 12,23 пг/мл - средним показателем (AUC=0,68).

Таблица 3

Статистическая значимость различий между группой больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ и здоровых лиц (статистика U Манна-Уитни)

Показатель	Группа больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ Median (percentile 10/90), (n-47)	Группа здоровых лиц Median (percentile 10/90), (n-33)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,16 (0,09/0,25)	0,13(0,1/0,15)	<b>0,01</b>
СРБ в сыворотке, мг/л	6,99 (1,88/10,29)	2,30 (0,22/2,3)	<b>0,001</b>
СРБ в супернатанте, мкг/л	49,57 (16,25/106)	18,34 (1,7/32,6)	<b>0,001</b>
ЛПА в сыворотке, нг/мл	42,65 (26,9/40,5)	8,68 (5,66/8,68)	<b>0,001</b>
ЛПА в супернатанте, нг/мл	37,73 (23,55/55,25)	25,60 (13,53/45,85)	<b>0,001</b>
ФВ в супернатанте, ЕД/мл	1,10 (0,87/1,37)	0,04(0,01,0,05)	<b>0,04</b>
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	5,59 (3,34/8,8)	1,92 (0,8/1,92)	<b>0,001</b>
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	2,38 (0,72/4,51)	0,26 (0/0,51)	<b>0,001</b>
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	499,89 (29/2154)	39,38(0/120,35)	<b>0,001</b>
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	157,12(23,73/257,64)	18,25 (0/35,39)	<b>0,04</b>
Дефензины в сыворотке, пг/мл	4389,94(2096,6/7932,0)	626,37 (270,40/1376,00)	<b>0,03</b>
Дефензины в супернатанте, пг/мл	656635(406000/921150)	117206,1(11420/200000)	<b>0,01</b>
ИЛ 6 в в сыворотке, пг/мл	12,67 (1,3/52,64)	1,04 (0,8/1,5)	<b>0,001</b>
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	48,13 (0/154,25)	5,34 (0/24,4)	<b>0,001</b>

Для комплексной оценки различий белково-пептидного паттерна больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и ГБ выбраны значения концентрации дефензинов-альфа в супернатантах, ИЛ-6 и ФНО-альфа в сыворотке крови, а также величина ЛВСЛ, на основании которых построено уравнение логистической регрессии:  $y = -9,545 + 36,288 * x_1 + 0,000022028 * x_2 + 0,04186 * x_3 + 0,07562 * x_4$ , где  $x_1$  – величина ЛВСЛ,  $x_2$  – концентрация дефензинов-альфа в супернатантах,  $x_3$  – концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови и  $x_4$  – концентрация ФНО-альфа в сыворотке крови ( $p(\text{правдоподобия}) = 0,001$ ). Данный комплексный подход к дифференциальной диагностике этих заболеваний имел очень хорошую эффективность (AUC-0,83). Для показателей, включенных в данную модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%.



Установлено, что увеличение содержания дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах на 1% приводит к росту значения  $\gamma$  на 0,69%, величины ЛВСЛ – на 0,28%. Показано, что прирост концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови на 1% приводит к увеличению значения  $\gamma$  на 0,01%, а ФНО-альфа - на 0,03%.

Особенностью пациентов данной группы является то, что у них выявлена прямая зависимость между величиной ЛВСЛ, содержанием дефензинов-альфа ( $R=0,47, p=0,03$ ) и NT-proBNP ( $R=0,53, p=0,02$ ) в лейкоцитарных супернатантах. Показано, что, чем выше значение ЛВСЛ, тем больше процент сужения коронарных артерий по данным ангиографии ( $R=0,7, p=0,04$ ) и выше ФК ХСН ( $R=0,4, p=0,02$ ).

Таким образом, установлено, что у больных ИБС стабильного течения в сравнении с больными ГБ в сыворотке крови определялись более высокие значения концентрации ИЛ-6 и ФНО-альфа, в супернатантах – дефензинов-альфа, а также величины ЛВСЛ. Наилучшую статистическую эффективность в разграничении ИБС и ГБ имеют содержание дефензинов-альфа в супернатантах и величина ЛВСЛ. Эти данные свидетельствуют о прогрессирующем характере провоспалительных изменений в рамках сердечно-сосудистого континуума. У пациентов этой группы показано, что величина ЛВСЛ отражает тяжесть атеросклеротических изменений и клинических проявлений ХСН.

### **Результаты экспериментального исследования *in vitro***

В ходе работы из подгруппы больных ИБС со стенокардией напряжения отобраны 12 человек для проведения экспериментальной работы *in vitro*. В исследование включены 7 мужчин и 5 женщин в возрасте от 57 до 63 лет, находящиеся на плановом стационарном обследовании и лечении в кардиологическом отделении. Вся группа соответствовала III ФК стенокардии напряжения. У 8 пациентов (67%) была выявлена ХСН на уровне III ФК (по NYHA), у 4-х пациентов (33%) признаки ХСН на уровне II ФК (по NYHA). У всех пациентов выделяли лейкоциты из венозной крови с помощью системы Vacutainer BD, содержащей декстрозу. Клеточную суспензию отмывали физиологическим раствором натрия хлорида, затем питательной средой Игла-МЕМ. Полученную суспензию лейкоцитов в количестве 400 мкл помещали в 2 стерильных пенициллиновых флакона. В первый флакон сразу добавляли 1% лизирующий раствор тритон X-100 в объеме 45 мкл для достижения целевой концентрации 0,1%. Экспозиция для лизиса осуществлялась в течение 10 минут. В полученном лейкоцитарном лизате иммунохемилюминисцентным методом осуществлялась молекулярная диагностика

содержания NT-proBNP и СРБ. Во втором флаконе осуществлялось культивирование клеточной суспензии, обогащенной лейкоцитами, в среде Игла-МЕМ на протяжении 72 часов при 37 °С. На 3 сутки производилась процедура лизиса клеток, описанная выше, с последующей молекулярной диагностикой в лизате содержания тех же белков.

Проведена оценка динамики содержания в лизатах изучаемых белков. Исходно в лейкоцитарных лизатах содержалось в среднем 190 (80/340) мкг/л СРБ, содержание которого через 72 существенно не изменилось и составило 154 (40/290) мкг/л. Динамика изменения концентрации показателя была статистически недостоверной ( $p > 0,05$ ) (у 58% содержание этого белка снизилось, а у 42% повышалось). Исходная концентрация в лизатах NT-proBNP составила в среднем 22,7 (9/29) пг/мл, а через 72 часа культивирования возросла до 31,8 (12,1/31,5) пг/мл (у 78% – повышалась, у 22% – снизилась) ( $p = 0,034$ ).

Таким образом, эксперимент продемонстрировал, что в ходе культивирования в условиях тесного межклеточного контакта концентрация NT-proBNP достоверно возрастала. Данный факт косвенно свидетельствует в пользу возможности продукции NT-proBNP в культурах лейкоцитов больных ИБС, имеющих ХСН.

#### **Результаты обследования больных ишемической болезнью сердца нестабильного течения в сочетании с гипертонической болезнью**

Эту подгруппу составили 19 больных ИБС с первичной нестабильной стенокардией среднего возраста  $60,3 \pm 3,5$  (SD) лет (percentile 10% - 55, percentile 90% - 64). У 67% пациентов отмечалась клиника прогрессирующей стенокардии, 19% - подострой стенокардии покоя и 4% - острой стенокардии покоя. Среди обследованных этой группы преобладали мужчины (58%), курящие табак (71%), с отягощенным семейным анамнезом (74%). Структура тяжести ХСН была следующей: 20% имели I ФК ХСН, 40% - II ФК ХСН, 35% - III ФК ХСН и 5% - IV ФК ХСН.

Полученные результаты УЗИ сердца позволяют констатировать преобладание БДМ (67%) у данной категории пациентов.

Анализ взаимосвязи ФК ХСН, определенного в тесте 6 минутной ходьбы с on-line мониторингом ЧСС, и показателей УЗИ сердца выявил сильную прямую связь ФК ХСН и линейных размеров левого предсердия ( $R = 0,8$ ,  $p = 0,035$ ), правого желудочка ( $R = 0,8$ ,  $p = 0,04$ ), толщины стенок левого желудочка ( $R = 0,8$ ,  $p = 0,04$ ), что, по всей видимости, отражает процессы ремоделирования сердца.

На основании проведенного ангиографического исследования выявлен стенозирующий характер коронарного атеросклероза.

Всем пациентам с ИБС нестабильного течения выполнена специальная программа обследования (таблица 4). Статистический анализ различий изучаемых показателей у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией показал, что у больных ИБС нестабильного течения величина ЛВСЛ была значимо выше ( $0,21 \pm 0,02$  ммоль/л), чем у пациентов со стабильным течением ( $0,16 \pm 0,06$  ммоль/л) ( $p=0,041$ ) (таблицу 4).

Таблица 4

**Статистическая значимость различий между группой больных ИБС нестабильного течения и стабильного течения в сочетании с ГБ (статистика U Манна-Уитни)**

Показатель	Группа больных ИБС нестабильного течения в сочетании с ГБ Median (percentile 10/90), (n-19)	Группа больных ИБС со стабильной стенокардией в сочетании с ГБ Median (percentile 10/90), (n-47)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,21 (0,19/0,24)	0,16 (0,09/0,25)	0,03
СРБ в сыворотке, мг/л	7,26 (1,62/15,10)	6,99 (1,88/10,29)	0,7
СРБ в супернатанте, мкг/л	29,23 (6,85/59,95)	49,57 (16,25/106)	0,1
ЛПв в сыворотке, нг/мл	35,35 (31,75/37,85)	42,65 (26,9/40,5)	0,5
ЛПв в супернатанте, нг/мл	44,12 (32/53,2)	37,73 (23,55/55,25)	0,2
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	4,52 (3,09/6,05)	5,59 (3,34/8,8)	0,3
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	1,79 (0,67/2,81)	2,38 (0,72/4,51)	0,7
NT-проBNP в сыворотке, пг/мл	185,35 (65/698,76)	499,89 (29/2154)	0,3
NT-проBNP в супернатанте, пг/мл	88,31(11,02/203,40)	157,12(23,73/257,64)	0,4
Дефензины в сыворотке, пг/мл	6004,88(2170,60/10396)	4389,94(2096,6/7932,0)	0,4
Дефензины в супернатанте, пг/мл	650560(204850/1034500)	656635(406000/921150)	0,1
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	12,85 (1,6/52,4)	12,67 (1,3/52,64)	0,2
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	3,75 (0/18,75)	48,13 (0/154,25)	0,1

Путем построения ROC кривых определена разделительная эффективность изученных биомаркеров между больными со стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией. Значение ЛВСЛ у больных ИБС нестабильного течения более  $0,18$  ммоль/л ( $AUC=0,77$ ) расценивалось как хороший, а сывороточной концентрации дефензинов-альфа более  $4000$  пг/мл ( $AUC=0,65$ ) – как средний по эффективности разделительный критерий стабильного и нестабильного течения заболевания.

Для комплексной оценки разделительной эффективности двух показателей – величины ЛВСЛ и значения концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови построено уравнение регрессии:  $y = -48,281 + 269,175 * x_1 + 0,000137627 * x_2$ , где  $x_1$  – величина ЛВСЛ, а  $x_2$  – концентрация дефензинов-альфа в сыворотке крови ( $p(\text{правдоподобия}) = 0,03$ ). По значению  $\gamma$  проведен ROC анализ, выявивший у данной математической модели отличные разделительные свойства между больными с нестабильной и стабильной стенокардией (AUC-0,94) (диаграмма 5).

Для показателей, включенных в данную модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение значения величины ЛВСЛ на 1% приводит к росту значения  $\gamma$  на 0,89%, концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови – на 0,11%, что свидетельствует о главенствующей роли величины ЛВСЛ в разделении этих клинических форм ИБС.

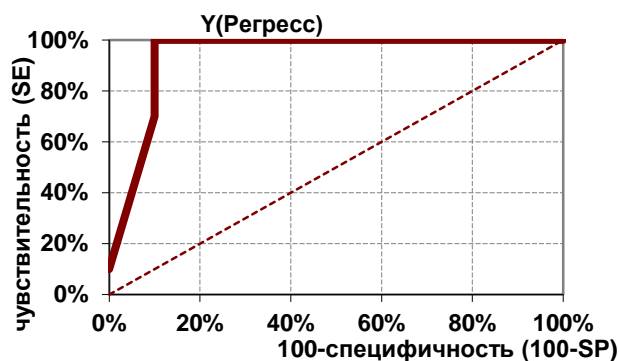


Диаграмма 5. ROC кривая, построенная по значениям  $\gamma$  у больных стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией

Взаимосвязей между изучаемыми маркерами и «традиционными» липидными факторами у пациентов данной подгруппы не установлено. У больных ИБС нестабильного течения отмечена прямая зависимость показателя, характеризующего противоинфекционный ответ (содержание дефензинов-альфа в сыворотке) с размерами ЛП (R=0,8, p=0,03), ММЛЖ (R=0,8, p=0,008) и тяжестью ремоделирования сердца (R=0,68, p=0,03).

Таким образом, выявлены достоверные различия больных стабильной и нестабильной стенокардией по величине ЛВСЛ. Математическая модель с включением значений величины ЛВСЛ и концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови, построенная для оптимизации разделения нестабильной и стабильной стенокардии напряжения, показала отличные дифференциально-диагностические возможности (AUC-0,94).

### **Результаты исследования в группе больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в сочетании с гипертонической болезнью**

Эту группу составили 52 пациента с ОААНК среднего возраста  $61,8 \pm 7,7$  (SD) лет (percentile 10% - 52, percentile 90% - 72). В группе больных ОААНК преобладали мужчины 67%, курящие табак (72%), лица с отягощенным семейным анамнезом - в 57%. Средняя продолжительность боли в ногах составила 3,7 (percentile 10% - 1,0, percentile 90% - 10) лет, дистанция безболевого ходьбы (ДБХ) в среднем была 85,8 (percentile 10%; - 0,0, percentile 90% - 200) м, что соответствует II б стадии ишемии нижних конечностей по Фонтейну - Покровскому. ЛПИ равнялся 0,49 (percentile 10%; - 0,25, percentile 90% - 0,71), что характерно для выраженного атеросклеротического повреждения артерий ног и отражает степень ишемии на грани критической. У 3% пациентов этой группы была I стадия, у 6% - 2а стадия, у 67% - 2б стадия, у 12% - 3а стадия, у 5% - 3б стадия и у 7% - 4 стадия ХАН. По данным дуплексного сканирования артерий нижних конечностей средний процент стеноза в исследуемых артериях составил 96% (percentile 10/90 - 30/100). При этом получена слабая корреляция степени стеноза артерий и тяжести ХАН ( $R=0,2$ ,  $p=0,04$ ), что свидетельствует о возможной активации механизмов ишемического прекондиционирования и развития коллатерального кровотока у данной категории пациентов. Наиболее сильная обратная взаимосвязь отмечена между степенью ХАН и ЛПИ ( $R=-0,6$ ,  $p=0,03$ ). Была произведена оценка морфологической структуры атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий нижних конечностей. Имеющиеся у пациентов бляшки разделены на следующие типы: плотные гомогенные бляшки (12%), гиперэхогенные бляшки с кальцинозом (42%); гетерогенные бляшки с преобладанием гипозоногенных структур (13%) и особый тип - бляшки с признаками тромбоза (33%). Первые 2 типа отнесены нами к «стабильным» бляшкам, а последние два - к «нестабильным». Кроме того проведена оценка уровня поражения артерий: 1 тип - дистальное поражение (20%), 2 тип - проксимальное поражение (53%), 3 тип - тотальное поражение (27%).

Как и у больных ИБС, всем пациентам с ОААНК проведено специальное исследование белковых и липидных факторов (таблица 5). Показано, что у больных ОААНК содержание СРБ, ЛПв в супернатантах, дефензинов-альфа в сыворотке, а также величина ЛВСЛ были выше, чем у здоровых лиц.

Проведена оценка разделительной эффективности изучаемых показателей между больными ОААНК и здоровыми лицами посредством ROC анализа.

Так как значения разделительной эффективности по результатам ROC анализа ниже 0,5 признаются неэффективными, для построения диаграммы Парето отобраны значения величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л (AUC=0,7), содержание в супернатантах СРБ - более 19,5 мкг/л (AUC=0,69), ЛПА - свыше 35,21 нг/мл (AUC=0,97), ФВ - более 0,05 ЕД/мл (AUC=0,68) и концентрация дефензинов-альфа в сыворотке крови - более 1300 пг/мл (AUC=0,74).

Таблица 5

**Статистическая значимость различий между группой больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в сочетании с ГБ и здоровых лиц (статистика U Манна-Уитни)**

Показатель	Группа больных ОААНК в сочетании с ГБ Median (percentile 10/90) (n-52)	Группа здоровых лиц Median (percentile 10/90) (n-33)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,16 (0,09/0,24)	0,13(0,1/0,15)	<b>0,01</b>
СРБ в сыворотке, мг/л	4,82 (0,45/19,12)	2,30 (0,22/2,3)	0,96
СРБ в супернатанте, мкг/л	59,16 (9,15/189,3)	18,34 (1,7/32,6)	<b>0,04</b>
ЛПА в супернатанте, нг/мл	56,54 (41,09/61,7)	25,60 (13,53/45,85)	<b>0,02</b>
ФВ в супернатантах, ЕД/мл	0,04(0,01/0,06)	0,04(0,01/0,05)	0,97
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	0,96(0,27/1,53)	1,92 (0,8/1,92)	0,3
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	0,2 (0/0,28)	0,26 (0/0,51)	0,7
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	114,67 (0/561,89)	39,38(0/120,35)	0,5
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	6,25(0/22,88)	18,25 (0/35,39)	0,3
Дефензины в сыворотке, пг/мл	1779,8(419,6/4888)	626,37 (270,40/1376,00)	<b>0,04</b>
дефензины в супернатанте, пг/мл	147933(31260/200000)	117206,1(11420/200000)	0,1
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	9,4 (8/10)	1,04 (0,8/1,5)	0,09
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	4,59 (0/17,7)	5,34 (0/24,4)	0,1

Диаграмма Парето построена для всей группы больных ОААНК в сочетании с ГБ (диаграмма б), так и по подгруппам в зависимости от экоструктуры бляшек (диаграмма 7 и 8). Анализ построенных диаграмм Парето позволяет говорить о том, что у больных ОААНК наиболее часто выявляемый белковый фактор в лейкоцитарных супернатантах – ЛПА, что может быть связано с активностью репаративных процессов у данной категории пациентов (роль ЛПА, как фактора неоангиогенеза). При появлении признаков нестабильности бляшки возрастает частота выявляемости в лейкоцитарных супернатантах

СРБ, что объясняется влиянием этого фактора на воспалительный процесс, свойственный «катастрофической бляшке».

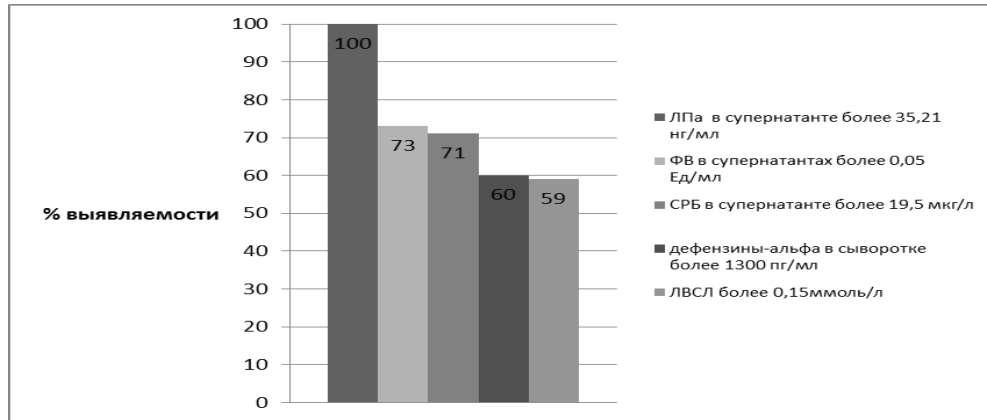


Диаграмма 6. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ

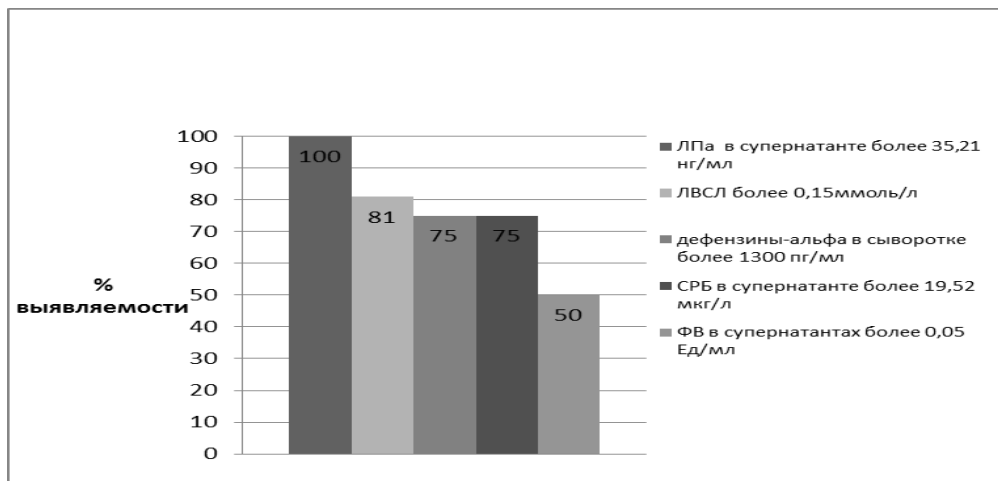


Диаграмма 7. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ со "стабильными" бляшками

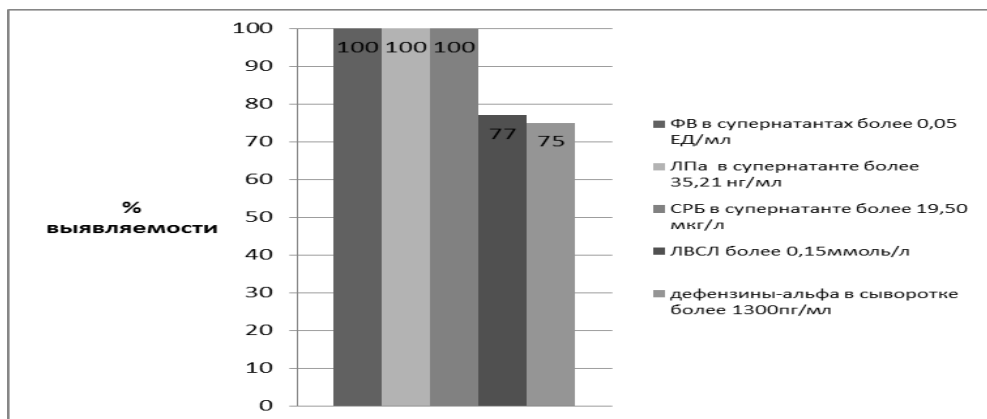


Диаграмма 8. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК, ассоциированным с ГБ, с "нестабильными" бляшками

В результате ROC анализа показано, что наилучшая разделительная эффективность между пациентами с ОААНК и здоровыми лицами, расцениваемая как отличная, имеется у величины содержания ЛПА в супернатантах более 35,21 нг/мл (AUC=0,97). У пациентов с ОААНК в сочетании с ГБ, имеющих признаки «нестабильных» и «стабильных» атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий, установлено, что из всех факторов наилучшую разделительную эффективность имеет значение концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л (AUC-0,95).

Значение величины концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах для разделения «стабильного» и «нестабильного» характера атеросклеротического поражения сосудистого русла подтверждаются данными корреляционного анализа. Установлена сильная прямая зависимость «нестабильного» характера атеросклеротической бляшки с содержанием СРБ в лейкоцитарных супернатантах ( $R=0,82$ ,  $p=0,03$ ). Выявлена умеренной силы взаимосвязь нестабильного характера сосудистого поражения с концентрацией ФВ в супернатантах ( $R=0,62$ ,  $p=0,04$ ).

Для решения задачи комплексной оценки различий белково-пептидного паттерна больных ОААНК в сочетании с ГБ от здоровых лиц выбраны следующие показатели: концентрация в супернатантах СРБ, ЛПА, а также сывороточное содержание дефензинов-альфа и величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение:

$y = -58,697 + 97,496 * x_1 + 0,17927 * x_2 + 0,7043 * x_3 + 0,003719935 * x_4$ , где  $x_1$  - величина ЛВСЛ,  $x_2$  - концентрация СРБ в супернатантах,  $x_3$  - концентрация ЛПА в супернатантах,  $x_4$  - сывороточная концентрация дефензинов-альфа ( $p(\text{правдоподобия})=0,001$ ). Для оценки эффективности построенной модели в разделении больных ОААНК и здоровых лиц проведен ROC анализ. Данная модель по показателю AUC имеет отличные разделительные свойства (диаграмма 9). Для показателей, включенных в эту модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение значения величины ЛВСЛ на 1% приводит к росту значения  $\gamma$  на 0,36%, концентрации СРБ и ЛПА в лейкоцитарных супернатантах - на 0,09% и 0,49% соответственно, а значения сывороточного содержания дефензинов-альфа - на 0,05%.



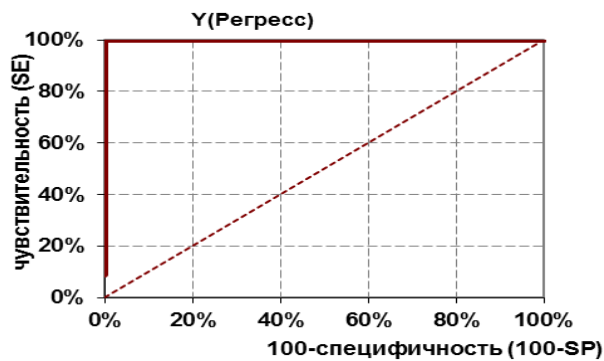


Диаграмма 9. ROC кривая, построенная по значению  $\gamma$  у больных ОААНК в сочетании с ГБ

Проведен статистический анализ различий изучаемых биомаркеров у больных ОААНК и ИБС стабильного течения. Показано, что у больных ОААНК содержание в супернатантах СРБ и ЛПА значимо выше, чем у пациентов с ИБС стабильного течения, что косвенно свидетельствует о большей репаративной и воспалительной направленности происходящих у них процессов. Проведенный ROC анализ выявил, что оптимальный разделительный маркер между больными ОААНК и ИБС со стабильной стенокардией напряжения – концентрация ЛПА в лейкоцитарных супернатантах свыше 56,68 нг/мл (AUC-0,9).

Корреляционный анализ изучаемых специальных показателей с клиническими, лабораторными и инструментальными параметрами показал, что между величиной ЛВСЛ и ЛПИ, интегрально характеризующего тяжесть сосудистых поражений, имеется умеренной силы обратная взаимосвязь ( $R=-0,48$ ,  $p=0,001$ ).

В проведенном нами исследовании у больных ОААНК отмечена корреляция концентрации холестерина сыворотки крови с содержанием в ней дефензинов-альфа ( $R=0,8$ ,  $p=0,02$ ) и ИЛ-8 ( $R=0,8$ ,  $p=0,04$ ), свидетельствующая о взаимосвязи процессов воспаления с «традиционными» липидными факторами.

Таким образом, результаты исследования показали, что больные ОААНК отличались увеличением ЛВСЛ, а также концентраций СРБ и ЛПА в супернатантах лейкоцитарных культур и дефензинов-альфа в сыворотке. Установлено, что из всех факторов наилучшую разделительную эффективность между больными с «нестабильными» и «стабильными» атеросклеротическими бляшками имеет значение концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании этого выбраны показатели (концентрация в сыворотке дефензинов-альфа, СРБ и ЛПА в супернатантах, а также величина ЛВСЛ) для создания математической

модели, описывающей белково-пептидный паттерн, характерный для больных ОААНК. У больных ОААНК установлена прямая зависимость между показателями, маркирующими системный воспалительный ответ, связанными с функционированием нейтрофилов (дефензины-альфа и ИЛ-8), и концентрацией холестерина крови.

**Результаты исследования в группе больных атеросклерозом сочетанного течения, ассоциированного с гипертонической болезнью**

В данную группу включено 38 пациентов среднего возраста  $65,3 \pm 7,5$  (SD) лет (percentile 10% - 54, percentile 90% - 74). В группе больных сочетанным течением атеросклероза преобладали мужчины (87%), курящие табак (71%), лица с отягощенным семейным анамнезом по атеросклерозу (76%). Пациенты группы сочетанного течения атеросклероза, ассоциированного с ГБ, имели поражение двух или трех сосудистых бассейнов. У 20% больных отмечалось сочетание ИБС с цереброваскулярной болезнью (ЦВБ), 32% - ОААНК и ЦВБ, 41% - ОААНК и ИБС, а также 7% - ОААНК, ИБС и ЦВБ.

Больные с ОААНК имели признаки тяжелого нарушения кровообращения в нижних конечностях (ЛПИ  $< 0,5$ , низкие показатели линейной скорости кровотока). При этом, величина ЛПИ коррелировала с тяжестью ХАН (по классификации Фонтейна-Покровского) ( $R = -0,59$ ,  $p = 0,04$ ).

Результаты дуплексного сканирования магистральных ветвей грудной аорты, выполненного у пациентов этой группы, также свидетельствовали о наличии стенозирующего атеросклероза. Средний процент стеноза брахиоцефальных артерий составил 50% (percentile 10/90- 30/67), а толщина комплекса интима-медиа -1,2 мм (percentile 10/90- 1/1,4). У 12 пациентов этой группы ранее проводилась коронароангиография, выявлявшая стенозирующее поражение в среднем 4 артерий (percentile 10/90- 3/6).

Среди больных с поражением коронарного русла были лица с III ФК (67%) и II ФК (33%) ХСН. В 100% случаев у пациентов этой группы выявлялся III ФК стенокардии напряжения. Анализ средних значений показателей УЗИ сердца позволяет констатировать наличие у этих пациентов признаков дилатации ЛП (42 (percentile 10%-35, percentile 90%-48), мм), увеличения конечного диастолического размера ЛЖ (5,7 (percentile 10%-4,8, percentile 90%-7), см), ИММЛЖ (143 (percentile 10%-101, percentile 90%-183), г/м<sup>2</sup>), СДЛА (26 (percentile 10%-19, percentile 90%-37), мм рт ст) и снижение ФВ ЛЖ (51 (percentile 10%-44, percentile 90%-59), %). Структура морфо-функциональных изменений была следующей: у 22% пациентов не выявлено структурно-функциональных изменений по данным УЗИ сердца, у 20% отмечена БДМ, у 25% - АРМ и у 33% - ДРМ. Следует отметить, что

достоверных корреляций между ФК ХСН и показателями УЗИ сердца не выявлено, что может быть объяснено активностью адаптационных механизмов у пациентов данной группы.

Результаты специального исследования у больных сочетанным течением атеросклероза приводятся в таблице 6. Установлено, что содержание в сыворотке СРБ, NT-proBNP, VIIф и дефензинов-альфа было значимо выше у больных сочетанным течением атеросклероза, чем у здоровых лиц (таблица 6). Показано, что у пациентов данной группы достоверно более высокие, чем у здоровых концентрации NT-proBNP, СРБ, ЛПА, VIIф и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах. Величина ЛВСЛ у больных данной группы также значимо превышала таковую здоровых лиц группы сравнения (таблица 6).

Проведено изучение разделительной эффективности исследуемых биомаркеров у больных сочетанным течением атеросклероза и здоровых лиц путем проведения ROC анализа.

Исходя из анализа значений AUC, исследуемые биомаркеры разделены следующим образом. Сывороточная концентрация дефензинов-альфа более 1700 пг/мл ( $AUC=0,92$ ) расценивается как отличный разделительный критерий между больными сочетанным атеросклерозом и здоровыми лицами. Концентрации в супернатантах ЛПА - более 28,59 нг/мл ( $AUC=0,86$ ), дефензинов-альфа - более 210000 пг/мл ( $AUC=0,86$ ), а в сыворотке крови СРБ - более 3,97 мг/л ( $AUC=0,87$ ), VIIф - более 2,15 нг/мл ( $AUC=0,86$ ) и ИЛ-6 - более 1,72 пг/мл ( $AUC=0,82$ ) определены как очень хорошие критерии разделения. Величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л ( $AUC=0,7$ ), содержание в лейкоцитарных супернатантах СРБ более 21 мкг/л ( $AUC=0,73$ ), VII фактора свертывания более 0,69 нг/мл ( $AUC=0,66$ ), NT-proBNP более 21 пг/мл ( $AUC=0,73$ ), ФВ более 0,05 ЕД/мл ( $AUC=0,78$ ), в сыворотке - NT-proBNP более 47,74 пг/мл ( $AUC=0,74$ ) расцениваются как хорошие разделительные критерии. Содержание VIIф в лейкоцитарных супернатантах более 0,69 пг/мл ( $AUC=0,66$ ) и ИЛ-8 в сыворотке крови более 4,89 пг/мл ( $AUC=0,65$ ) - как средние по эффективности дифференциально-диагностические критерии.

Таблица 6

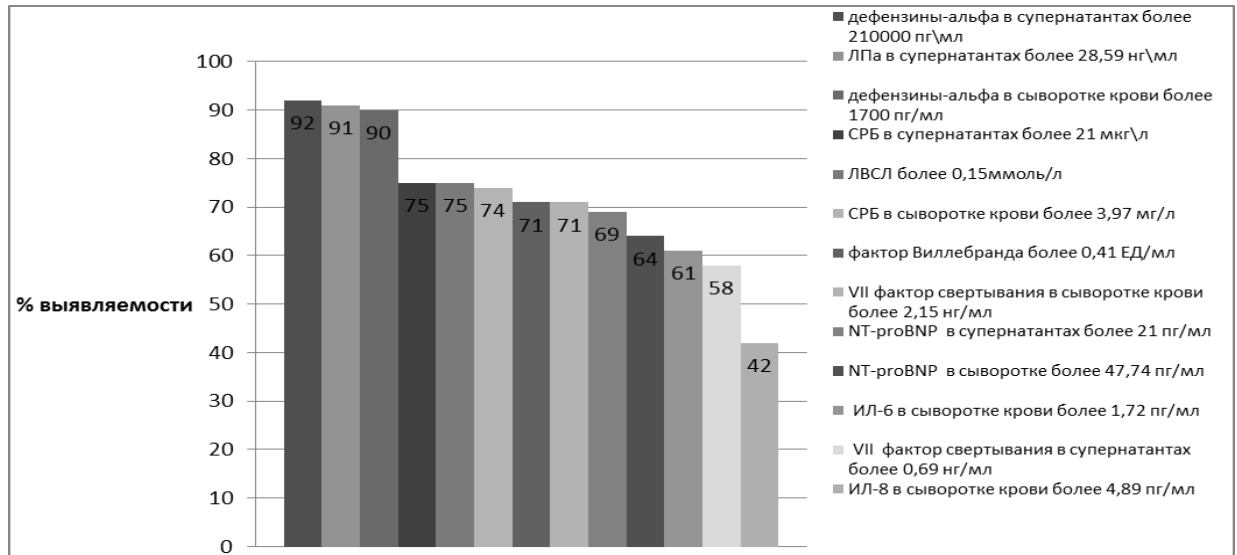
Статистическая значимость различий между группами с сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБ, и здоровых лиц (статистика U Манна-Уитни)

Показатель	Группа больных сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБ Median (percentile 10/90), (n-38)	Группа здоровых лиц Median (percentile 10/90), (n-33)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,18 (0,12/0,25)	0,13(0,1/0,15)	<b>0,01</b>
СРБв сыворотке, мг/л	5,99 (1,64/16,01)	2,30 (0,22/2,3)	<b>0,001</b>
СРБ в супернатанте, мкг/л	61,19 (10,75/127,10)	18,34 (1,7/32,6)	<b>0,001</b>
ЛПА в супернатанте, нг/мл	60,93 (33,51/61,50)	25,60 (13,53/45,85)	<b>0,001</b>
ФВ в супернатанте, ЕД/мл	1,15 (0,67/1,36)	0,04(0,01,0,05)	<b>0,04</b>
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	2,69 (1,67/4,89)	1,92 (0,8/1,92)	<b>0,01</b>
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	1,75 (0,77/4,32)	0,26 (0/0,51)	<b>0,01</b>
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	389,89 (88/2189)	39,38(0/120,35)	<b>0,01</b>
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	57,12(2,73/227,98)	18,25 (0/35,39)	<b>0,04</b>
Дефензины в сыворотке, пг/мл	2123,49(596,6/9528)	626,37 (270,40/1376,00)	<b>0,03</b>
Дефензины в супернатанте, пг/мл	667540(89720/862150)	117206,1(11420/200000)	<b>0,01</b>
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	9,42 (0,8/56,47)	1,04 (0,8/1,5)	<b>0,05</b>
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	27,02 (0/125,5)	5,34 (0/24,4)	<b>0,1</b>

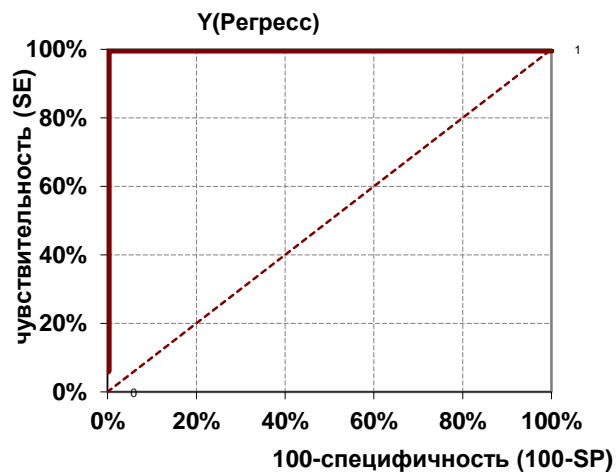
По полученным точкам разделения построена диаграмма Парето (диаграмма 10). Установлено, что в супернатантах больных сочетанным атеросклерозом наиболее часто выявляются высокие концентрации дефензинов-альфа, ЛПА и СРБ. ЛВСЛ, превышающая 0,15 ммоль/л, также часто выявляемый показатель у пациентов данной группы.

С целью комплексной оценки белково-пептидного паттерна выбраны: концентрация в супернатантах СРБ, ЛПА, NT-proBNP, дефензинов-альфа, сывороточное содержание дефензинов-альфа, СРБ и VIIф, а также величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ. Получено следующее уравнение:  $y = -42,546 + 52,346 * x_1 + 0,02402 * x_2 + 0,452 * x_3 + 0,0175924 * x_4 + 0,00012186 * x_5 + 0,000013773 * x_6 + 1,17857 * x_7 + 3,48366 * x_8$ , где  $x_1$ - величина ЛВСЛ,  $x_2$ - концентрация СРБ в супернатантах,  $x_3$ - концентрация ЛПА в супернатантах,  $x_4$ - концентрация NT-proBNP в супернатантах,  $x_5$ - сывороточная концентрация дефензинов-альфа,  $x_6$ - концентрация дефензинов-альфа в супернатантах,  $x_7$ - сывороточная концентрация СРБ,  $x_8$ - сывороточная концентрация VIIф ( $p(\text{правдоподобия}) = 0,001$ ). Данная модель по показателю AUC имеет отличные свойства) (диаграмма 11). Для показателей, включенных в данную модель, определен

средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение величины ЛВСЛ на 1% приводит к приросту значения  $\gamma$  на 0,21%, концентрации ЛПА в лейкоцитарных супернатантах – на 0,46%, СРБ – на 0,01%, NT-proBNP – на 0,01%, дефензинов-альфа – на 0,08%, содержания дефензинов-альфа в сыворотке – на 0,01%, СРБ – на 0,06% и VIIф – на 0,15%.



**Диаграмма 10. Диаграмма Парето, построенная по выявляемости высокого содержания сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных с сочетанным течением атеросклероза, ассоциированного с ГБ**



**Диаграмма 11. ROC кривая, построенная по значению  $\gamma$  у больных сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБ**

Проведен сравнительный анализ различий изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных сочетанным течением атеросклероза, ИБС, ОААНК и ГБ. Наиболее существенные различия выявлены между группой больных сочетанного атеросклероза и ОААНК. Установлено, что у больных с сочетанным течением атеросклероза значимо выше содержание в супернатантах VIIф, NT-proBNP, дефензинов-альфа, а в сыворотке крови – VIIф и NT-proBNP. Между группой больных с сочетанным

атеросклерозом и ИБС различия были менее существенны, однако в группе больных с множественным поражением сосудистых бассейнов отмечалась значимо большая концентрация СРБ и ЛПА в лейкоцитарных супернатантах. В сравнении с больными ГБ у пациентов с сочетанным поражением сосудистых бассейнов выявлены более высокие значения ЛВСЛ, концентрации ЛПА в супернатантах и NT-proBNP в сыворотке.

Таким образом, у больных сочетанным течением атеросклероза в сыворотке достоверно выше содержание СРБ, NT-proBNP, VII фактора свертывания и дефенинов-альфа, а в супернатантах лейкоцитарных культур NT-proBNP, СРБ, ЛПА, VIIф и дефенинов-альфа, чем у здоровых лиц. Величина ЛВСЛ у больных сочетанным атеросклерозом значимо превышала таковую у здоровых лиц группы сравнения. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация дефенинов-альфа, СРБ и VIIф в сыворотке крови и СРБ, ЛПА, NT-proBNP, дефенинов-альфа в супернатантах, а также величина ЛВСЛ) для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн, характерный для больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированного с ГБ.

**Результаты исследования в подгруппах больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с гипертонической болезнью, получавших статины и отказавшихся от их приема**

Исходно только 5% больных с сочетанным течением атеросклероза получали ранее назначенную терапию статинами в непрерывном режиме, 95% обследуемых в течение 3-х месяцев до включения в исследование липидкорректирующую терапию не получали. Всем пациентам были назначены статины: симвастатин, аторвастатин, розувастатин. При повторном визите пациентов через 6 месяцев после первичного обследования оценивался режим приема препарата, непрерывность приема и соблюдение рекомендованных доз. В результате только 63% (24 человека) соблюдали рекомендации, остальные 37% (14 человек) либо не принимали препарат совсем, либо в меньшей дозе или с перерывами. Наилучший комплаинс отмечался в подгруппе пациентов сочетанного с ИБС течения (77% пациентов принимали статины). Данное обстоятельство позволило разделить наблюдавшихся в динамике пациентов на 2 подгруппы в зависимости от наличия липидкорректирующей терапии статинами.

При изучении динамики заболевания за 6-ти месячный период наблюдения выявлено ухудшение течения заболеваний, ассоциированных с атеросклерозом, а именно, снижение ДБХ, увеличение ФК стенокардии напряжения, уменьшение ЛПИ,

рецидивирование симптома «перебегающей хромоты» в подгруппе пациентов, не принимавших статины (таблица 7).

В подгруппе пациентов, принимавших статины, в динамике закономерно наблюдалось достоверное снижение содержания ЛПНП и ТГ в сыворотке крови (таблица 8). У пациентов, отказавшихся от приема статинов, значимых изменений показателей липидного спектра не наблюдалось.

Таблица 7

<b>Оценка состояния больных с сочетанным течением атеросклероза в зависимости от приема статинов</b>		
<b>Клиническая оценка</b>	<b>статины +</b>	<b>статины -</b>
без изменений	82%	74%
ухудшение	18 %	26%

Статистически значимой динамики показателей УЗИ сердца не выявлено ни в группе больных получавших статины, ни в группе отказавшихся от их приема.

Таблица 8

**Сравнение динамики показателей липидного спектра на фоне терапии статинами у больных с сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ**

Показатель	Исходно	В динамике	р
	Me;10%;90%		
ЛПНП, ммоль/л	2,59;2,38;4,12	2,27;1,97;3,12	0,01
ТГ, ммоль/л	1,74;1,12;2,54	1,18;1,09;1,98	0,04

Проведена оценка динамики ЛВСЛ в этих подгруппах (таблица 9).

Таблица 9

**Динамика ЛВСЛ в подгруппах пациентов, получавших статины и отказавшихся от их приема**

Показатель	ЛВСЛ исходно, ммоль/л	ЛВСЛ в динамике, ммоль/л	р
	Me;10%;90%		
Статины +	0,16; 0,09; 0,24	0,12; 0,1; 0,16	<b>0,034</b>
Статины -	0,17; 0,09; 0,25	0,15; 0,09; 0,26	0,89

Как видно из представленных данных у пациентов, принимавших статины в течение 6-ти месяцев, достоверно снижалась ЛВСЛ в отличие от пациентов, отказавшихся от их приема.

В динамике у пациентов с сочетанным течением атеросклероза оценивалось содержание в супернатантах СРБ, ЛПа, VII фактора свертывания и дефензинов-альфа, а в сыворотке крови - ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО альфа (таблица 10).

У пациентов, получавших комплексную терапию с включением статинов, в динамике наблюдалось снижение содержания СРБ и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах. Значимых различий по содержанию ЛПа и VIIф в супернатантах, а также изучаемых цитокинов в сыворотке крови не получено. Данный факт, по всей видимости, объясняется тем, что доля СРБ и дефензинов-альфа в белковой секреции нейтрофилов значимо больше, чем ЛПа и VII фактора. Факт снижения белковой продукции

нейтрофилами под влиянием терапии статинами описан в научной литературе (Sugano R., 2005; van Oostrom A.J., 2006; Zarbock A., 2008).

Таким образом, показано, что 6-ти месячная терапия статинами приводит к снижению величины ЛВСЛ, концентрации СРБ и дефензинов-альфа в супернатантах, что отражает их плейотропные свойства.

Таблица 10

**Динамика лейкоцитарных и сывороточных факторов в подгруппах пациентов, получавших статины и отказавшихся от их приема**

Подгруппы пациентов	Показатель	Исходно	В динамике	p
		Ме;10%;90%		
Подгруппа пациентов, получавших статины	СРБ супернатантах, мкг/л	46,94;10,40;91,20	34,35;4,30;78,85	0,040
	ЛПа супернатантах, нг/мл	51,69;30,11;72,89	55,64;28,58;77,79	0,890
	VII фактор супернатантах, нг/мл	2,05;0,53;3,80	2,92;0,55;6,4	0,940
	Дефензины супернатантах	608454;200000;949000	369154;89720;465123	0,045
	ИЛ-6, нг/мл	11,67;1,3;44,57	7,98;1,55;29,40	0,350
	ИЛ-8, нг/мл	26,54;0;112,00	7,55;0;14,80	0,440
	ФНО альфа, нг/мл	34,62;1,1;102,10	17,75;1,85;25,05	0,290
Подгруппа пациентов, отказавшихся от приема статинов	СРБ супернатантах, мкг/л	44,95;10,50;107,50	39,68;14,88;88,15	0,5640
	ЛПа супернатантах, нг/мл	54,67;35,39;61,50	59,34;31,33;81,44	0,960
	VII фактор супернатантах, нг/мл	1,02;0,1;1,4	1,03;0,2;1,4	0,940
	Дефензины супернатантах	548191;57260;720000	574324;59727;7582000	0,550
	ИЛ-6, нг/мл	6,98;0,8;18,56	7,45;0,95;20,33	0,650
	ИЛ-8, нг/мл	39,71;0;136,90	28,55;0;124,81	0,120
	ФНО альфа, нг/мл	8,86;1,65;16,7	10,35;2,46;29,87	0,390

### **Концепция дезадаптации механизмов воспаления и врожденного иммунитета в рамках сердечно-сосудистого континуума у больных атеросклерозом различных локализаций**

Нами получены данные, подтверждающие большое значение нейтрофилов в процессах атеросклеротического поражения сосудов и ремоделирования сердечно-сосудистой системы. Нейтрофилы, накапливаясь в сосудистой стенке, в условиях тесного межклеточного контакта и стимуляции различными факторами (цитокинами, липидами, иногда микроорганизмами) реализуют свои программы белковой продукции. Основная эволюционная задача нейтрофилов - защита макроорганизма от чужеродных, в первую



очередь, микробных, антигенов. В последние годы большое внимание уделяется изучению системы врожденного иммунитета, одной из функций которого является активация экспрессии белков на антигенпрезентирующих клетках. Было показано, что большинство адъювантов, имитируя микробную инфекцию, инициируют рецепторы врожденной иммунной системы и вызывают выделение белков. Ключевую роль в этой системе играют Толл-подобные рецепторы (TLR), через которые при контакте с определенными структурными компонентами активируется синтез антимикробных пептидов, в том числе дефензинов-альфа.

Эволюционная роль большинства из изученных нами белковых факторов состоит в уничтожении и отграничении чужеродного антигена. Так дефензины-альфа и СРБ непосредственно связаны с системой противомикробного иммунитета, ЛПА - с репаративной активностью и ангиогенезом, ФВ и VIIF - с тромботическими процессами, отграничивающими чужеродный очаг. Часть из этих белков синтезируются конституционально (ЛПА, VIIF и др), другие преимущественно индуцибельно (СРБ) и, наконец, концентрация ряда белков может определяться, как конституциональным синтезом, так и индуцибельным (дефензины-альфа). Многие из этих факторов обладают атерогенной активностью. Исходя из этого, индивидуумы, получив эволюционно сформированный механизм защиты, «расплачиваются» активностью процессов атерогенеза.

На основании анализа научной литературы и собственных данных сформулирована концепция дезадаптации механизмов воспаления и врожденного иммунитета в рамках сердечно-сосудистого континуума у больных атеросклерозом различных локализаций, состоящая в том, что процесс формирования атеросклеротических поражений следует рассматривать как измененную активность механизмов, связанных с эволюционно сформированной системой белковой продукции лейкоцитами, в первую очередь нейтрофилами, выступающей как компонент ограничения и уничтожения чужеродных антигенов. Специфика «доминант» белкового синтеза, выявленная у больных ИБС и ОААНК, определяется влиянием сопутствующих и фоновых патогенетических процессов таких, как активация гуморальных факторов, принимающих участие в формировании ХСН у больных ИБС и воспалительно-трофических поражений нижних конечностей у пациентов с ОААНК.

Исходя из данной концепции, последовательность процессов атерогенеза может быть следующей. В ответ на типоспецифическую стимуляцию различными факторами, такими как окисленные липиды, компоненты клеточных стенок микробных агентов,

происходит активация TLR и других распознающих рецепторов системы врожденного иммунитета, имеющих на мембранах нейтрофилов, последними запускаются механизмы продукции ряда белково-пептидных агентов, например, дефензинов-альфа и СРБ. Процесс высвобождения нейтрофилами белков регулируется также опосредованно через взаимодействие с другими клетками, в том числе эндотелиоцитами. Таким образом, реализуется связь процессов гемодинамического повреждения эндотелия (артериальная гипертензия) и воспаления. Часть высвобождаемых белково-пептидных факторов синтезируются непосредственно нейтрофилами (СРБ, дефензины-альфа и, возможно ЛПА и NT-proBNP), другие накапливаются в цитоплазме последних в ходе процесса интернизации, то есть прижизненного обмена клеточными компартментами с другими клетками (ФВ, VIIф). Паттерн высвобождаемых биологически-активных веществ определяется влиянием ассоциированных патогенетических процессов (ХСН, ишемия органов и др.). Действие каждого из высвобождаемых факторов направлено на отграничение чужеродного агента путем его непосредственного уничтожения (СРБ и дефензины-альфа), ограничения регионального кровотока – тромбоза (ФВ, VIIф, ЛПА) или путем активации неоангиогенеза (ЛПА). Однако генетически predeterminedенная система реагирования на вторжение чужеродных агентов в условиях постоянной стимуляции (дислипидемия, АГ и другие факторы) носит дезадаптивный характер и способствует, а иногда инициирует, атерогенез.

### **ВЫВОДЫ**

1. У больных различными сердечно-сосудистыми заболеваниями независимо от локализации атеросклероза и степени его выраженности установлено нарушение белокпродуцирующей функции нейтрофилов – увеличение содержания дефензинов - альфа (1-3) в лейкоцитарных супернатантах, а также концентрации этих пептидов в сыворотке крови.
2. Степень нарушения белокпродуцирующей функции нейтрофилов и липидвысвобождающей способности лейкоцитов отражает процессы сердечно-сосудистого континуума: локальное поражение артерий у больных облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей сопровождается увеличением продукции липопротеина (а) и С-реактивного белка; поражение артерий у больных ишемической болезнью сердца, а также сочетанным течением атеросклероза ассоциировано с увеличением продукции лейкоцитами дефензинов альфа (1-3), VII фактора свертывания крови, фактора Виллебранда, липопротеина (а) и С-реактивного белка в сочетании с признаками системной воспалительной реакции, маркируемой высокими концентрациями

С-реактивного белка, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли альфа в сыворотке крови.

3. Величина липидвысвобождающей способности лейкоцитов, содержание С-реактивного белка и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах у больных атеросклерозом различных локализаций взаимосвязаны с тяжестью и активностью атеросклеротического поражения артерий, что подтверждается результатами обследования больных сочетанным течением атеросклероза и нестабильной стенокардией, взаимосвязью с распространенностью и выраженностью атеросклероза по данным инструментальных исследований, выявлением высоких концентраций С-реактивного белка в лейкоцитарных супернатантах при наличии признаков нестабильности атеросклеротических бляшек.

4. Структурно-функциональные нарушения миокарда у больных ишемической болезнью сердца взаимосвязаны с нарушениями белоксинтезирующей функции нейтрофилов: увеличением продукции предшественника мозгового натрийуретического пептида, дефензинов-альфа, а также с системной воспалительной реакцией, сопровождающейся увеличением сывороточных концентраций С-реактивного белка, дефензинов-альфа, интерлейкинов-6 и -8, NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида.

5. Экспериментально установлено увеличение концентрации предшественника мозгового натрийуретического пептида в культурах лейкоцитов (нейтрофилов) по отношению к исходным значениям у больных ишемической болезнью сердца в сочетании с хронической сердечной недостаточностью.

6. Комплексная оценка белково-пептидного паттерна в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах с использованием методов математического моделирования позволяет улучшить эффективность дифференциальной диагностики между различными клиническими формами атеросклероза.

7. У больных сочетанным течением атеросклероза комплексная терапия с включением статинов приводит к снижению величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов, концентрации С-реактивного белка и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах по сравнению с больными, отказавшимися от приема статинов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для клинических исследований предлагается методика определения белокпродуцирующей способности культуры лейкоцитов больных атеросклерозом,

позволяющая диагностировать ранние и поздние стадии атерогенеза, выявлять критерии стабильной и нестабильной форм стенокардии, «стабильности» и «нестабильности» атеросклеротического поражения сосудов, а также проводить дифференциальную диагностику различных клинических форм атеросклероза.

2. Рекомендованы новые маркеры ранних стадий атерогенеза у больных гипертонической болезнью. Диагноз атеросклероза становится вероятным при превышении концентрации дефензинов-альфа (1-3) в сыворотке крови более 1300 пг/мл, а в супернатантах – дефензинов-альфа более 210000 пг/мл и NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида более 21 пг/мл.

3. Предлагается алгоритм диагностики ишемической болезни сердца, который включает определение величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов, дефензинов-альфа (1-3), С-реактивного белка, липопротеина (а), VII фактора свертывания, фактора Виллебранда, NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида в супернатантах, а также – дефензинов-альфа (1-3) в сыворотке крови. Диагноз ИБС становится вероятным при превышении значений величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов - более 0,15 ммоль/л, концентрации дефензинов-альфа в супернатантах - более 210000 пг/мл, С-реактивного белка - более 25,33 мкг/л, липопротеина (а) - более 28,23 нг/мл, NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида - более 21 пг/мл, фактора Виллебранда - более 0,07 ЕД/мл, VII фактора свертывания - более 0,64 нг/мл, дефензинов-альфа в сыворотке - более 1700 пг/мл.

4. Разработан алгоритм диагностики нестабильной стенокардии, который включает изучение величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов и концентрации дефензинов-альфа (1-3) в сыворотке крови. При превышении значений величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов более 0,18 ммоль/л и сывороточной концентрации дефензинов-альфа более 4000 пг/мл подобный диагноз является вероятным.

5. Предлагается алгоритм диагностики облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей, который включает определение содержания в лейкоцитарных супернатантах липопротеина (а) и С-реактивного белка, в сыворотке крови – дефензинов-альфа (1-3), а также величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов. Диагноз становится вероятным при превышении значений концентраций в супернатантах липопротеина (а) более 35,21 нг/мл, С-реактивного белка более 19,5 мкг/л,

в сыворотке – дефензинов-альфа (1-3) более 1300 пг/мл и величины липидвысвобождающей способности более 0,15 ммоль/л.

6. Предлагается определять концентрацию С-реактивного белка в лейкоцитарных супернатантах для выявления активности процессов атерогенеза. Вероятность наличия у пациентов с атеросклерозом «нестабильных» атеросклеротических бляшек возрастает при превышении концентрации С-реактивного белка в лейкоцитарных супернатантах более 70 мкг/л.

7. Предложено использовать определение содержания в лейкоцитарных супернатантах белков (С-реактивного белка, дефензинов-альфа (1-3)) и липидвысвобождающей способности лейкоцитов для контроля эффективности проводимой терапии статинами.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### **Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и представленных в базе РИНЦ, SCOPUS, патенты РФ**

1. Бурцева Т.В. Показатели сывороточных биомаркеров и липидвысвобождающей способности лейкоцитов при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца с разной степенью тяжести сердечной недостаточности / Т.В. Бурцева, В.Ю. Мишланов, А.В. Туев, В.Е. Владимирский // Врач-аспирант.- 2011.- Т. 3.- № 3.- С. 482-489.
2. Мишланов В.Ю. Липидвысвобождающая способность лейкоцитов и провоспалительные биомаркеры у больных с сочетанным течением артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца в зависимости от функционального класса хронической сердечной недостаточности / В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, Л.И. Сыромятникова, Т.В. Бурцева, О.В. Харузина // Здоровье семьи-XXI век. Электронное научное издание.- 2012.- № 1.- 0421200104/0012.
3. Валеева А.Г. Маркеры воспаления у больных ишемической болезнью сердца в период реабилитации на курорте Усть-Качка / А.Г. Валеева, В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский // Врач-аспирант. 2013.- Т. 58.- № 3.- С. 82-87.
4. Мишланов В.Ю. Белоксинтезирующая и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных ишемической болезнью сердца в раннем и отдаленном периодах после коронарного шунтирования / В.Ю. Мишланов, С.Г. Суханов, В.Е. Владимирский, Т.А. Половинкина // Врач-аспирант.- 2013.- Т. 58.- № 3.- С. 103-110.

5. Харузина О.В. Липидвысвобождающая способность лейкоцитов – фактор риска развития атеросклероза и маркер активности атеросклеротического процесса у больных атеросклерозом артерий нижних конечностей и синдроме диабетической стопы / О.В. Харузина, П.Я. Сандаков, В.Ю. Мишланов, Н.Н. Середенко, В.Е. Владимирский // Перм. мед. журн.- 2013.- №4.- С. 49-55.
6. Мишланов В.Ю. Дефензины-альфа, пептиды и белки, синтезируемые и высвобождаемые нейтрофилами при атеросклерозе разной локализации / В.Ю. Мишланов, С.Г. Суханов, П.Я. Сандаков, А.В. Ронзин, В.Е. Владимирский, Л.И. Сыромятникова, Т.А. Половинкина, Н.Н. Середенко, О.В. Харузина// Клин. Лаб. Диагн.- 2014.- № 5.- С. 13-17.
7. Мишланов В.Ю. Сывороточные маркеры воспаления и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных артериальной гипертензией и стенокардией напряжения/ В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, Л.И. Сыромятникова, Т.А. Половинкина, С.Л. Мишланова // Клин. Медицина.- 2013.- Т.91.- № 11.- С. 34-38.
8. Мишланов В.Ю. Протеинсинтезирующая функция нейтрофилов и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных атеросклерозом /В.Ю. Мишланов, П.Я. Сандаков, А.В. Ронзин, В.Е. Владимирский, Л.И. Сыромятникова, Т.А. Половинкина, Н.Н. Середенко, О.В. Харузина, С.Л. Мишланова // Клин. Медицина.- 2013.- Т. 91.- № 12.- С. 17-21.
9. Vladimirsky E.V. An Investigation into Hypolipidemic, Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of the Inclusion of the Dietary Preventive Product “Garmonicum Oil with Crude Turpentine” in the Diet of Patients with Arterial Hypertension and Ischemic Heart Disease/ E.V. Vladimirsky, I.P. Bobrovniksky, E.N. Borodina, V.E. Vladimirsky, N.M. Abasheva and M. Oborin//World Journal Medical Sciences. – 2013.-V. 9 (3). - P.167-172.
10. Сыромятникова Л.И. Липидвысвобождающая и белоксинтезирующая активность лейкоцитов у больных атеросклерозом / Л.И. Сыромятникова, А.В. Ронзин, В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, Т.А. Половинкина // Вестник Пермского научного центра УрО РАН.- 2014.- № 2.- С. 79-86.
11. Мишланов В.Ю. Новые патофизиологические механизмы актуальных респираторных и сердечно-сосудистых заболеваний и перспективы разработки методов диагностики на основе измерения электрического импеданса органов грудной клетки // В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, Л.И. Сыромятникова, В.В. Савкин, А.Л. Зуев, А.И. Судаков, Н.В. Шакиров, С.Г. Езов // Вестник Пермского научного центра УрО РАН.- 2014.- № 2.- С. 87-100.

12. Сыромятникова Л.И. Лейкоцитарные и сывороточные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных гипертонической болезнью начальных стадий/ Л.И. Сыромятникова, В.Е. Владимирский, В.Ю. Мишланов// Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2.- URL: <http://www.science-education.ru/122-17351>.
13. Владимирский В.Е. Белокпродуцирующая функция нейтрофилов у больных коронарным атеросклерозом /В.Е.Владимирский// Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1.- URL: <http://www.science-education.ru/121-17420>.
14. Мишланов В.Ю. Лейкоцитарные и сывороточные факторы риска у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей/ В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1; URL: <http://www.science-education.ru/121-17493>.
15. Патент РФ № 2462175 от 27.09.2012. «Способ диагностики функционального класса хронической сердечной недостаточности у больных стенокардией». Авторы: В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова, Е.А. Челбаева.
16. Патент РФ № 2530593 от 14.08.2014. «Способ оценки белок синтезирующей функции лейкоцитов для клинических исследований». Авторы: В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова.

#### **Публикации в других изданиях**

1. Мишланов В.Ю. Изучение новых лабораторных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний / В.Ю. Мишланов, Д.В. Сидоров, В.Е. Владимирский, М.А. Путилова А.Г. Валеева // IX Всероссийская научно–практическая конференция «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении»: сборник материалов. – Санкт-Петербург, 2009 – С. 45.
2. Сидоров Д.В. Цитокиновый статус у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями: клиническое значение дополнительных факторов риска / Д.В. Сидоров, В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, М.А. Путилова, А.Г. Валеева // XVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сборник материалов конгресса (тезисы докладов). – Москва, 2009. – С. 251.
3. Бурцева Т.В. Показатели сывороточных биомаркеров и липидвысвобождающей способности лейкоцитов при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца с разной степенью тяжести сердечной недостаточности / Т.В. Бурцева, В.Ю. Мишланов, А.В. Туев, В.Е. Владимирский // Сборник тезисов Материалов II Съезда терапевтов Юга России. – М., 2011.- С. 51.

4. Бурцева Т.В. Липидвысвобождающая способность лейкоцитов при стабильной стенокардии с различной степенью тяжести сердечной недостаточности. / Т.В. Бурцева, В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, А.В. Туев, // Сборник тезисов Материалов I съезда терапевтов Приволжского Федерального Округа.- М., 2011.- С.40.
5. Бурцева Т.В. Липидвысвобождающая способность лейкоцитов при артериальной гипертензии и при ишемической болезни сердца / Т.В. Бурцева, В.Ю. Мишланов, А.В. Туев, В.Е. Владимирский // Сборник тезисов Материалов I съезда терапевтов Приволжского Федерального Округа. – М., 2011. - С.39.
6. Половинкина Т.А. Липидвысвобождающая способность лейкоцитов и сывороточные биомаркеры системной воспалительной реакции у больных с сочетанным течением артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца, проявляющейся стенокардией напряжения, в зависимости от функционального класса хронической сердечной недостаточности / Т.А. Половинкина, О.В. Харузина, Т.В. Бурцева, В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский// Материалы межрегиональной научной конференции.- Пермь, 2012.- С. 123-127.
7. Черешнев В.А. Новые механизмы развития атеросклероза и ключевая роль холестерина /В.А. Черешнев, В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, Т.А. Половинкина// Вестн. Росс. Военно-мед. академии. - 2013.- 2(42).- С. 63-64.
8. Половинкина Т.А. Белоксинтезирующая и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных ишемической болезнью сердца в раннем и отдаленном периодах после коронарного шунтирования / Т.А. Половинкина, С.Г. Суханов, В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский // Вестн. Росс. Военно-мед. академии. - 2013.- 2(42).- С. 48-49.
9. Валеева А.Г. Взаимосвязь результатов теста шестиминутной ходьбы и воспалительных маркеров сердечно-сосудистого риска у больных ишемической болезнью сердца / А.Г. Валеева, В.Е. Владимирский, В.Ю. Мишланов // XIII Съезд кардиологов Юга России «Актуальные вопросы этиологии, патогенеза, диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний»: сборник материалов. – Ростов-на-Дону, 2014. – С. 12.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Сокращенное название	Полное название
АРМ	адаптивное ремоделирование миокарда
БДМ	бессимптомная дисфункция миокарда
ГБ	гипертоническая болезнь
ДБХ	дистанция безболевого ходьбы
ДРМ	дезадаптивное ремоделирование миокарда
ИЛ-6	интерлейкин-6
ИЛ-8	интерлейкин-8
ИММЛЖ	индекс массы миокарда левого желудочка
ИФА	иммуноферментный анализ
КДО	конечный диастолический объем
КДР	конечный диастолический размер
КСО	конечный систолический объем
КСР	конечный систолический размер
ЛВСЛ	липидвысвобождающая способность лейкоцитов
ЛЖ	левый желудочек
ЛП	левое предсердие
ЛПa	липопротеин (a)
ЛПВП	липопротеиды высокой плотности
ЛПИ	лодыжечно-плечевой индекс
ЛПНП	липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	липопротеиды очень низкой плотности
МЖП	межжелудочковая перегородка
ММЛЖ	масса миокарда левого желудочка
ОААНК	облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей
СДЛА	среднее давление в легочной артерии
СКФ	скорость клубочковой фильтрации
СРБ	С-реактивный белок
ССЗ	сердечно-сосудистые заболевания
ССК	сердечно-сосудистый континуум
ТГ	триглицериды
ТИМ	толщина интимы-медии
УО	ударный объем
ФВ	фактор Виллебранда
ФВ ЛЖ	фракция выброса левого желудочка
ФК	функциональный класс
ФНО-альфа	фактор некроза опухоли-альфа
ХАН	хроническая артериальная недостаточность
ХБП	хроническая болезнь почек
ХСН	хроническая сердечная недостаточность
ЦВБ	цереброваскулярная болезнь
ЧСС	частота сердечных сокращений
BNP	мозговой натрийуретический пептид
NT-proBNP	NT фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида
TLR	TOLL подобные рецепторы

Подписано в печать 19.03.2015. Формат 60\*90/16.

Усл. печ. л. 2. Тираж 100 экз. Заказ № 74/2015.

Отпечатано с готового оригинала-макета  
в типографии издательства «На Дружбе».

Адрес: 514070, г. Пермь, ул. Дружбы, 34а.

Тел. (342)220-01-38.