

УДК 616.132.2-008.6-036.11-089.819.5

Цапаева Н.Л.¹, Константинова Е.Э.², Русских И.И.³, Миронова Е.В.¹, Мельникова Г.Б.², Чижик С.А.², Тарашкевич Н.В.¹, Черноглаз П.Ф.⁴, Юрлевич Д.И.⁵, Кужель Н.С.², Толстая Т.Н.²

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

⁴ 1-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

⁵ 9-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Tsapayeva N.¹, Konstatinova E.², Russkikh I.³, Mironova E.¹, Melnikova G.², Chizhik S.², Tarashkevich N.¹, Chernoglaz P.⁴, Yurlevich D.⁵, Kuzhal N.², Tolstaya T.²

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² A.V. Lykov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³ Belarusian Scientific Practical Center of Cardiology, Minsk, Belarus

⁴ 1st city Clinical Hospital, Minsk, Belarus

⁵ 9th city Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Биофизические и биохимические критерии риска кардиоваскулярных осложнений у пациентов с острым коронарным синдромом

Biophysical and biochemical risk criteria of cardiovascular complications in patients with acute coronary syndrome

Резюме

В статье представлены результаты исследования структурно-функциональных характеристик клеток крови с помощью метода атомно-силовой микроскопии и маркера биомеханического стресса ST2 при остром коронарном синдроме. Установлен биофизический механизм формирования ишемии и диагностическая значимость ST2, модуля упругости и степени агрегации эритроцитов в прогнозировании течения и исхода ОКС.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, тромболитизис, первичное чрескожное коронарное вмешательство, маркеры повреждения миокарда.

Abstract

The article presents the results of the study of structural and functional characteristics of blood cells with atomic force microscopy and biomechanical stress marker ST2 in acute coronary syndrome. We determined biophysical mechanism of ischemia and diagnostic significance of ST2, the modulus of elasticity and degree of aggregation of erythrocytes to predict the course and outcome of acute coronary syndrome.

Keywords: acute coronary syndrome, thrombolysis, primary percutaneous coronary intervention, markers of myocardial damage.

■ ВВЕДЕНИЕ

Ведущим фактором, определяющим прогноз у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), является быстрое и полноценное восстановление кровотока в коронарной артерии. Оно может быть достигнуто с помощью тромболитической терапии (ТЛТ) или первичным чрескожным вмешательством (ЧКВ) – ангиопластикой и стентированием [1]. Однако несмотря на своевременное и эффективное проведение этих мероприятий, в ряде случаев предотвратить новые коронарные катастрофы не удастся. Это определяет поиск новых маркеров риска возникновения коронарных событий и уточнение патогенетических звеньев, влияющих на течение и исход ОКС [2]. В настоящее время идет интенсивный поиск новых биомаркеров, способных выявить пациентов с высоким риском неблагоприятных исходов после перенесенного ОКС. К ним, по имеющимся данным [3], относится биомаркер ST2 («маркер биомеханического стресса», «стимулирующий фактор роста», «маркер фиброза кардиомиоцитов»), экспрессируемый геном 2 и ассоциирующийся с риском развития кардиоваскулярных осложнений [4]. Реологические свойства крови в ряде случаев определяют морфофункциональное состояние микроциркуляторного русла и играют прогностическое значение в течение и исходе ОКС [5]. В этой связи представляется чрезвычайно актуальным определить истинные структурно-функциональные изменения эритроцитов и тромбоцитов при возникновении ОКС, что может быть реализовано с помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) [6], сведений о чем в проанализированной нами литературе нет. Это определяет актуальность проблемы и явилось мотивацией для проведения настоящего исследования.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить особенности структурно-функциональных свойств клеток крови в патогенезе развития ишемического повреждения миокарда и определить диагностическую значимость маркера биомеханического стресса до и после экстренной реваскуляризации миокарда при ОКС.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 136 человек. На первом этапе для отработки и адаптации диагностических методов, впервые использовавшихся у пациентов с ОКС, заборы крови у которых осуществлялись в условиях скорой помощи или при проведении ЧКВ, исследованы образцы крови у 92 человек, из них у 32 пациентов с ОКС (средний возраст – $48,8 \pm 8,4$ года), у 30 пациентов со стабильной стенокардией (СС), (средний возраст – $51,9 \pm 6,4$ года) и образцы крови 30 здоровых доноров (средний возраст $28,9 \pm 6,4$ года). В клиническое исследование включено 44 пациента с ОКС. У 40 пациентов с ОКС, выписанных из стационара (18 – подвергшихся ТЛТ, с использованием метализе, средний возраст $59,6 \pm 5,8$ года), 22 – ЧКВ, $61,9 \pm 4,9$ года), обследование проведено в условиях динамического наблюдения в течение года. По локализации инфаркта, наличию факторов риска (АГ, курение, уровень гликированного Нb, липопротеидов низкой плотности – ЛПНП, индекс массы тела – ИМТ) пациенты в группах сравнения достоверно не отличались.

Критерии включения: пациенты с ОКС и подъемом сегмента ST, которым произведен тромболизис на этапе скорой помощи в течение не более 3 ч от возникновения ангинозного статуса; пациенты с подъемом и без подъема сегмента ST, которым произведена экстренная рентген-эндоваскулярная реваскуляризация миокарда – ЧКВ в течение 2 ч от возникновения ангинозного статуса, в соответствии с Рекомендациями и Протоколами диагностики и лечения пациентов с ОКС.

Критерии исключения из исследования: исходная сердечная недостаточность более ФК2 по NYHA; ишемический и геморрагический инсульт в анамнезе; почечная недостаточность (ХЗП>3 ст.); клинически и лабораторно подтвержденная патология печени.

Забор крови у пациентов с ОКС осуществлялся до проведения тромболизиса или экстренного ЧКВ. Отработан алгоритм доставки образцов для исследования – до 2 ч после забора крови. Использовались системы для забора венозной крови: вакутайнеры на 2 мл с K² ЭДТА, двусторонняя игла 21G 1 ½ и держатель для игл. Метод взятия крови из вены через иглу непосредственно в стерильную вакуумную пробирку (вакутайнер) исключал любой контакт с кровью пациента, обеспечивал прямой ток крови во избежание гемолиза и образования микрогустков. Система позволяла при однократной венепункции производить взятие крови в несколько пробирок с различными наполнителями и для различных целей. Наличие в пробирке строго дозированного в заводских условиях вакуума обеспечивало строго определенный объем забираемой крови и стандартно воспроизводимое соотношение кровь / добавка для каждого образца. Образцы крови для исследования маркера ST2 подвергались центрифугированию (3000 об/15 мин), аликивировались и замораживались. Измерение концентрации ST2 в плазме крови проводилось методом количественного иммуноферментного анализа (ИФА) (Critical Diagnostics Presage ST2). Анализ проводился в 96-луночных микропланшетах, дно лунок которых покрыто моноклональными антителами. Разбавленные образцы плазмы крови вносили в соответствующие лунки микропланшета и инкубировались в течение необходимого времени. После этапов промывки реагенты удалялись из лунок микропланшета, вносились дополнительные реагенты, которые впоследствии вымывались. Аналит обнаруживался при добавлении колориметрического реагента, результирующий сигнал измерялся спектрофотометрически (при 450 нм).

Исследование геометрии, структуры поверхности и упругих свойств мембраны форменных элементов крови осуществляли при помощи комплекса АСМ (Беларусь). Оценка упругих свойств мембраны клеток – модуль упругости эритроцитов (МУЭ Мпа), тромбоцитов (МУТ Мпа) – осуществлялась методом статической силовой спектроскопии. Суть метода – контактное деформирование исследуемого объекта острием зонда и измерение зависимости силы взаимодействия зонда с поверхностью образца от расстояния между ними. Изменение вязкоупругих характеристик мембраны клетки (силы адгезии, нН) фиксировали путем измерения модуля упругости по модели Герца на АСМ NT-206 с использованием стандартных кремниевых зондов NSC 11, жесткость 3 Н/м («MikroMash»). Последующая обработка данных проводилась с помощью программ Surface Explorer, Microsoft Office Excel и Origin. Определе-

ние среднего размера и параметров шероховатости проводилось после обработки АСМ-изображений в программе Surface Explorer.

Степень агрегации эритроцитов (САЭ) определяли по скорости их оседания за 2 ч в стандартизованных стеклянных капиллярах ("Dräger & Heerhorst GmbH & Co.KG", Германия). Параметры агрегации эритроцитов оценивали по графику, построенному путем фиксации границы «плазма-эритроциты» каждые 10 мин.

Обследование включало ведение клинического протокола, определение маркеров ишемического повреждения миокарда, включая высокочувствительный тропонин (T_{hs}), Д-димеры (Dd), С-реактивный белок (СРБ), биохимический и общий анализ крови, ЭКГ и ЭХО-КГ в динамике, коронароангиографию.

Лечение пациентов проводилось со строгим соблюдением протоколов ведения пациентов с ОКС на догоспитальном и стационарном этапах.

Статистическая обработка результатов, представленных в данном фрагменте исследования, проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7.0. с вычислением среднего значения и его ошибки. Достоверность различий определялась по критерию Стьюдента ($p < 0,05$). Выбор диагностически значимых параметров осуществлялся при помощи оценки статистической значимости различия выборок по среднему значению и по изменчивости исследуемой величины, проведенный с помощью многофакторного анализа.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определены нормативные значения концентрации ST2 методом ИФА в группе доноров, которые составили: для здоровых мужчин 6,5–20,4 нг/мл (медиана 17,6 нг/мл), у женщин – 4,1–20,5 нг/мл (медиана 16,8 нг/мл), в общей группе 2,79–24,23 (медиана 17,9 нг/мл). Определено референтное значение $ST2 < 18$ нг/мл [7], что соответствует рекомендациям производителя. Определены оптимальные режимы сканирования поверхности клеток крови и разработана структура базы данных для архивации и математической обработки результатов исследования на АСМ. Установлены значения МУЭ и силы адгезии у здоровых лиц и пациентов с СС: $142,3 \pm 24,3$ Мпа, $23,3 \pm 2,4$ нН; $118,2 \pm 15,3$ Мпа, $25,3 \pm 2,6$ нН соответственно [8]. В течение госпитального периода у 14 пациентов (31,8%) из 44, включенных в клиническое исследование, наблюдались следующие осложнения ОИМ: летальный исход – у 4 (9%), острая левожелудочковая недостаточность – у 1 (2,3%), возобновление ангинозных болей после ТЛТ – у 3 (6,8%), перинфарктная стенокардия – у 3 (6,8%), рецидив ИМ – у 1 (2,3%), жизнеопасные нарушения ритма сердца – у 2 (4,5%) пациентов, по наличию которых пациенты были распределены на группы благоприятного течения ($n=30$), неблагоприятного ($n=10$) и группу с летальным исходом ($n=4$). В таблице представлены результаты динамического наблюдения за пациентами с ОКС в течение года, в зависимости от течения и исхода заболевания.

Группу благоприятного течения составили 22 пациента, подвергшихся первичному ЧКВ и 8 пациентов, которым на этапе СП проведена ТЛТ (метализе). В группу пациентов с осложненным течением вошли 10 пациентов, которым экстренная реваскуляризация была проведена

Динамика показателей структурно-функционального состояния эритроцитов и маркера биомеханического стресса у пациентов с ОКС, подвергшихся экстренной реваскуляризации миокарда

Сроки наблюдения Показатель	исходно	1 месяц	3 месяца	12 месяцев
	Благоприятное течение ОКС (n=30)			
САЭ, мм/2 ч	87,5±9,2	54,8±6,7**	50,4±5,7**	37,9±5,8***
МУЭ, МПа	79,7±12,3	91,2±12,9**	96,3±13,4**	104,5±13,8***
_{hs} Tl, нг/мл	0,04±0,008	<0,01**	–	–
_{hs} CRP, мг/л	2,8±0,8	<1,0***	–	–
Dd, нг/мл	600±22,3	<200***	–	–
Неблагоприятное течение ОКС (n=10)				
САЭ, мм/2 ч	96,3±10,1	84,5±9,8*	76,2±8,9**	42,4±9,1***
МУЭ, МПа	74,8±4,7	87,4±10,1	89,9±11,2*	92,7±12,3**
_{hs} Tl, нг/мл	0,12±0,014	<0,01***	–	–
_{hs} CRP, мг/л	4,3±1,3	1,8±0,3***	–	–
Dd, нг/мл	1200±48,3	<200***	–	–
Летальный исход на госпитальном этапе (n=4)				
САЭ, мм/2 ч	106,3±6,1	–	–	–
МУЭ, МПа	59,8±4,7	–	–	–
_{hs} Tl, нг/мл	2,02±0,09	–	–	–
_{hs} CRP, мг/л	6,3±1,3	–	–	–
Dd, нг/мл	1850±62,3	–	–	–

Примечание: различия достоверны по отношению к исходным значениям при уровне значимости *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

на этапе СП с использованием металлизе; группу летальных исходов составили 4 пациента, умерших в 1–3-и сут. после ОКС. У 3 пациентов этой группы диагностированы обширные трансмуральные инфаркты миокарда, у одной пациентки – циркулярный инфаркт миокарда, констатирован неэффективный тромболизис, отмечалась нестабильная гемодинамика, потребовавшая инотропной коррекции. При коронарографическом исследовании обнаружено гемодинамически значимое стенозирование 2 и более артерий, потребовавшее установление двух и более стентов. У всех пациентов был сахарный диабет 2-го типа, декомпенсированный на момент поступления в стационар, нарушение жирового обмена, у 2 пациентов в анамнезе – ХОБЛ. Как видно из таблицы, у всех пациентов с ОКС в исходном состоянии обнаружено достоверное снижение МУЭ. В наших предыдущих исследованиях [9] было установлено, что у большинства пациентов с ОКС отмечается «парадоксальное» увеличение деформируемости эритроцитов, определяемое методом фильтрации 2% суспензии клеток через мембранные ядерные фильтры с диаметром пор 3–5 мкм по величине индекса ригидности, превышающее ее значения у здоровых лиц, в то время как у пациентов в позднем периоде инфаркта миокарда при стабильной стенокардии у лиц с периферическим атеросклерозом этот показатель достоверно выше, чем у здоровых лиц. Используя в нашем исследовании метод АСМ, который позволяет визуализировать объекты с большим пространственным разрешением (0,1 нм) и проводить количе-

ственную оценку локальных механических свойств клеток и адгезивных сил, нам удалось установить изменения структурно-функционального состояния эритроцитов и их роль в патогенезе острого ишемического повреждения: значительное снижение модуля упругости и тенденция к повышению силы адгезии $29,8 \pm 2,6$ нН при ОКС, сопровождающееся значительным повышением САЭ. Установлено, что при ОКС тромбоциты отличаются сферической формой и наличием большего количества псевдоподий. МУТ у пациентов с ОКС выше, чем у практически здоровых лиц ($103,8 \pm 12,9$ Мпа, $84,7 \pm 7,2$ соответственно), что указывает на повышение степени активации кровяных пластинок. Использование метода АСМ для изучения микрорельефа и структуры поверхности клетки открывает широкие перспективы в развитии диагностических методов для уточнения патогенеза различных патологических состояний на клеточном уровне, в том числе при ОКС. Развитие метода с точки зрения математических подходов к обработке результатов дает возможность оценки не только морфологических показателей, но и механических и вязкостных свойств клеточных мембран.

Маркер биомеханического стресса ST2 – член семейства рецепторов интерлейкина-1. Белок ST2 имеет две изоформы, напрямую вовлеченные в развитие кардиоваскулярных событий: растворимая форма (sST2) и мембран-связанная форма рецептора (ST2L). Лигандом ST2 является цитокин – интерлейкин-33. Ответ здоровой сердечной ткани на повреждение или механический стресс включает продукцию и связывание интерлейкина-33 с ST2L, запуская кардиопротективный каскад предотвращения фиброза, ремоделирования сердца и сердечной недостаточности. sST2 блокирует кардиопротективный эффект интерлейкина-33, обуславливая развитие и углубление ишемии, вплоть до повреждения и некроза кардиомиоцитов [3, 4]. Исследование реакции ST2 на возникновение острого повреждения миокарда у пациентов с ОКС и его динамика после экстренной рентгенэндоваскулярной или тромболитической ревазуляризации миокарда у этих пациентов было предметом проведенного нами исследования. Как следует из таблицы, значительное повышение концентрации циркулирующего в крови ST2 в острейшем периоде ОКС (в первые часы ишемического повреждения) существенно более выраженное, чем уровень hs T1 в этом временном диапазоне, что указывает на его диагностическую значимость как маркера повреждения. При эффективной ревазуляризации миокарда, независимо от способа реперфузии, отмечалась нормализация показателя ST2 к 10-м сут. наблюдения. Выбор диагностически значимых параметров осуществлялся при помощи оценки статистической значимости различия выборок по среднему значению и по изменчивости исследуемой величины, проведенный с помощью многофакторного анализа. При уровне значимости различий показателя в подгруппах выше 0,05 он расценивался как диагностически значимый. В результате многофакторного анализа определен диагностически значимый комплекс показателей – степень агрегации и модуль упругости эритроцитов – САЭ и МУЭ, маркер биомеханического стресса ST2 и рассчитаны их значения в оценке прогноза ОКС: критерии риска неблагоприятного течения ОКС на госпитальном этапе: САЭ > 90 мм/2 ч, МУЭ < 70 Мпа, ST2 > 40 нг/мл; критерии, ассоциирующиеся с летальным исходом на госпитальном этапе:

САЭ > 100 мм/2 ч; МУЭ < 65 МПа; ST2 > 90 нг/мл; критерии повышенного риска повторных коронарных атак и формирования ХСН в течение года после ОКС: снижение САЭ менее чем на 30%, МУЭ < 85 МПа, ST2 > 35 нг/мл через 1 месяц наблюдения.

■ ВЫВОДЫ

1. Впервые использован метод атомно-силовой микроскопии и маркера биомеханического стресса ST2 для разработки алгоритма прогнозирования неблагоприятных исходов у пациентов с ОКС, подвергшихся экстренной тромболитической и/или рентгенэндоваскулярной реваскуляризации миокарда.
2. Установлен биофизический механизм формирования ишемии и повреждения миокарда при ОКС: достоверное снижение показателя модуля упругости эритроцитов, сопровождающееся повышением параметров силы их адгезии и степени агрегации.
3. Установленный факт значительного повышения концентрации циркулирующего в крови маркера биомеханического стресса ST2 в острейшем периоде ОКС и быстрая положительная динамика этого показателя после успешной экстренной реваскуляризации миокарда позволяет рассматривать его как диагностически значимый маркер повреждения миокарда и как критерий оценки эффективности лечения.
4. Установлена диагностическая значимость комплекса показателей: маркера фиброза миокарда ST2, показателя степени агрегации эритроцитов – САЭ и параметров АСМ, характеризующих упругие и адгезивные свойства клеточных мембран в отношении прогнозирования исхода ОКС.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Wijns W. (2014) Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart J.*, vol. 31, pp. 2501–2555.
2. Sabatine M.S. (2008) Complementary roles for biomarkers of biomechanical strain ST2 and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation*, no 117, pp. 1936–1944.
3. Kohl P. (2012) Role of ST2 in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome in the MERLIN-TIMI 36 Trial. *Clinical Chemistry*, vol. 58, pp. 1–10.
4. Gruzdeva O. (2015) Stimuliruyuschii faktor rosta ST2 – predictor neblagopriyatnogo gospital'nogo prognoza u patsientov s infarktomi miokarda [ST2 Stimulating Growth Factor – a predictor of hospital adverse prognosis in patients with myocardial infarction]. *Rossiiskii kardiologicheskii jurnal*, no 4, pp. 001–003.
5. Konstantinova E. (2005) Changes of the microcirculation state and the hemorheology parameters in acute coronary syndrome. *13th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology. (Siena, Italy, June 26-29, 2005)*, Abstract book, pp. 39–41.

6. Konstantinova E. (2015) Morfologicheskie i uprugie svo'stva eritritsitov, izuchennye s ispol'zovaniem metoda atomno-silovo' mikroskopii u patsientov s ostrym koronarnym sindromom [Morphological and elastic properties of red blood cells, studied with the method of atomic force microscopy in patients with acute coronary syndrome]. Proceedings of the *Klinicheskaya gemostaziologiya i gemoreologiya v serdechno-sosudisto' hirurgii*, Moskva, pp. 215–216.
7. Tsapaeva N. (2014) Issledovanie markera fibroza kardiomiotsitov u patsientov s ostrym koronarnym sindromom [The study of cardiomyocyte marker of fibrosis in patients with acute coronary syndrome]. *Evraziiskii jurnal vnutrenne' meditsiny*, no 01(03), pp. 23.
8. Konstantinova E. (2014) ASM-parametry morfologii i uprugih karakteristik eritrotsitov pri OKS [AFM morphology parameters and the elastic characteristics of red blood cells in patients with ACS]. Proceedings of the *Metodologicheskie aspekty skanirujuschei zondovo' mikroskopii*, Minsk, pp. 135–137.
9. Tsapaeva N. (2001) Mikrotsirculyatornue i gemoreologicheskie narusheniya u bol'nuh OKS [Microcirculatory and hemorheological disorders in patients with ACS]. Proceedings of the *Narusheniya mikrotsirculyatsii i ee vozrastnye osobennosti*, Kiev, pp. 35–37.

Поступила / Received: 01.06.2016
Контакты / Contacts: ekonst65@mail.ru