

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук

профессор Мишланов В.Ю.

Пермь 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1	ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
	1.1. Эпидемиология атеросклероза и ассоциированных с ним заболеваний.....	18
	1.2. Теории и гипотезы атерогенеза.....	20
	1.3. Роль лейкоцитов в атерогенезе.....	26
	1.4. Новые факторы риска атеросклероза.....	35
	1.5. Значение ряда белковых факторов в развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.....	35
Глава 2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
Глава 3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ БЕЗ КЛИНИЧЕСКИХ И УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ПРИЗНАКОВ АТЕРОСКЛЕРОЗА.....	83
Глава 4	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ	92
	4.1. Результаты исследования в общей группе больных ишемической болезнью сердца в сочетании с гипертонической болезнью.....	92
	4.2. Результаты исследования в группе больных ишемической болезнью сердца со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с гипертонической болезнью.....	105
	4.3. Результаты исследования в группе больных ишемической болезнью сердца с нестабильной стенокардией в сочетании с гипертонической болезнью	122
Глава 5	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ.....	131
Глава 6	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ СОЧЕТАННОГО ТЕЧЕНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ.....	146
	6.1. Результаты исследования в подгруппах больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с гипертонической болезнью, получавших и отказавшихся от приема статинов.....	159
	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	162
	ВЫВОДЫ.....	194
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	196
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	198

СПИСОК НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	200
---------------------------------------	------------

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Атеросклероз - мультисистемная глобальная проблема современного здравоохранения, решение которой позволит значительно снизить смертность и инвалидизацию населения. Его клиническая манифестация связана с ишемией органов кровоснабжаемых пораженными артериями. Наиболее часто встречающимися нозологиями, ассоциированными с атеросклерозом, являются ишемическая болезнь сердца (ИБС), цереброваскулярная болезнь (ЦВБ) и облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОААНК) [12,28,57,249].

Сложность проблемы заключается в том, что атерогенез начинается задолго до появления первых клинических признаков заболевания. Истинная распространенность атеросклероза, как патоморфологического процесса, у лиц старше 50 лет стремится к 100% [112]. Доказано, что гипертоническая болезнь (ГБ), поражающая до 39-45% взрослого населения развитых стран, является одним из ведущих факторов риска атеросклероза и представляет собой доклиническую фазу атеросклеротического поражения [237]. Присущая ей эндотелиальная дисфункция и гидродинамическая травма сосудистой стенки облигатно инициируют процесс атеросклеротического поражения [80].

Несмотря на длительный период исследований, этиология и патогенез атеросклероза остаются недостаточно изученными. Ни одна из существующих концепций атерогенеза не дает всех ответов на вопросы, возникающие в ходе его изучения. Наибольшую известность и доказательность получили инфильтрационная липидная теория Н.Н. Аничкова [7,66,96], модифицированная и уточненная в ходе последующих исследований, и воспалительная концепция атерогенеза [7,46,138,157,158,209], а также связанная с ней гипотеза «реакции на повреждение» [209].

В «фокусе» данных концепций патогенеза атеросклеротического поражения сосудистой стенки значимая роль отводится лейкоцитам. Известно, что хронически повышенное количество лейкоцитов в крови связано с увеличением долгосрочного риска ишемического инсульта, инфаркта миокарда или сосудистой смерти [55]. Доказано, что даже пограничные уровни лейкоцитов у больных с отягощенным сосудистым анамнезом коррелируют с повышенным риском развития ишемических сосудистых событий [97,274].

Лейкоцитарная инфильтрация сосудистой стенки в ходе атерогенеза достигается в процессе динамического каскада, который включает привлечение, направленное движение, собственно адгезию и миграцию клеток через сосудистую стенку. Воспалительные изменения в сосудистой стенке усиливают миграцию лейкоцитов в сосудистую стенку, и их количество значительно увеличивается [168].

Предприняты большие усилия для выяснения роли моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов в атерогенезе от его начальных этапов и до развития тромботических осложнений [105]. Напротив, роль полиморфноядерных нейтрофилов (ПМН) в развитии атеросклероза до недавнего времени изучалась недостаточно [272] в связи с тем, что нейтрофильные инфильтраты реже обнаруживаются в атеросклеротических бляшках по сравнению с другими воспалительными клетками [75]. В то же время все больше данных свидетельствует о ключевой роли этих клеток в развитии атеросклероза. Системное воспаление сопровождается активацией нейтрофилов и это, очевидно, сопряжено с дестабилизацией коронарного кровотока и увеличением количества циркулирующих нейтрофилов. Последний параметр рассматривают как показатель риска будущих сердечно-сосудистых исходов. Кроме того, ПМН активируются в ряде клинических состояний, связанных с высоким риском развития атеросклероза. Есть доказательства того, что часть атеропротективных эффектов статинов может быть связана с их способностью модулировать активность нейтрофильного воспаления в стенке артерии [233].

Показано, что нейтрофилы в процессе атерогенеза проникают в артерии, где их непродолжительный срок жизни продлевается воспалительными цитокинами [272]. Это способствует дальнейшему прогрессированию воспаления и нестабильности бляшки. Механизмы, с помощью которых нейтрофилы способствуют дестабилизации бляшки, находятся на стадии изучения. Выяснено, что они связаны с высвобождением активных форм кислорода, миелопероксидазы, протеолитических ферментов, метаболитов арахидоновой кислоты и ряда белков [75].

В 2002 г. А.В. Туевым и В.Ю. Мишлановым предложена методика оценки липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВСЛ) *in vitro* у больных ИБС и другими заболеваниями [22]. Было показано, что лейкоциты венозной крови больных ИБС обладают повышенной способностью к высвобождению белково-липидных комплексов при культивировании в неполной питательной среде в условиях тесного межклеточного контакта [10].

В связи с особенностью выполнения методики в культурах лейкоцитов, выделенных из венозной крови, преобладают ПМН, количество которых достигает 80%. Таким образом, выявленная способность лейкоцитов высвобождать белково-липидные комплексы обусловлена преимущественно функционированием нейтрофилов. В результате дальнейших исследований установлено, что увеличение данного показателя более 0,15 ммоль/л сочетается с нестабильным течением ИБС [14]. У больных атеротромботическим типом ишемического инсульта в лейкоцитарных супернатантах были обнаружены апопротеин (а) и высокочувствительный С-реактивный белок (hs-СРБ) [1]. В 2011г. Т.В. Бурцевой установлено увеличение ЛВСЛ у больных ИБС по мере нарастания функционального класса стенокардии и хронической сердечной недостаточности [2]. Выполненные исследования показали клиническую значимость данного показателя, зависимость преимущественно от активности нейтрофилов, в диагностике и прогнозировании атерогенеза.

В последнее время достигнуто понимание, что роль нейтрофилов может быть лучше понята через изучение их биохимических «следов» в районе, где

воспаление и их активация имели место или, даже в системном кровотоке, где исследуются продукты выделяющихся при активации нейтрофилов. [43,74].

В настоящее время существует достаточное количество исследований, посвященных изучению «новых» биомаркеров, имеющих отношение к патогенезу атеросклероза, например, маркеров коагуляционного каскада (фибриноген [85], ингибитор активатора плазминогена (РАI)-1 [87], маркеры агрегации тромбоцитов [87], VII фактор свертывания (VIIф) [87]) и липидных факторов (липопротеин (а) (ЛПа) [183], аполипопротеин В и мелкие плотные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) [183]). Кроме того в качестве маркера, рассмотрен показатель, характеризующий гемодинамический стресс (NT-фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP)) [212], а также маркеры хронической воспалительной реакции, например, высокочувствительный hs-CРБ [139] и чувствительные маркеры повреждения миокарда, которые уже оказались полезными в диагностике острого коронарного синдрома (ОКС) (высокочувствительные тропонины Т или I, белок, связывающий жирные кислоты) [59,183].

Следует отметить, что в большинстве исследований перечисленные молекулы изучались в сыворотке крови, что отражает интегральные процессы их синтеза и элиминации клетками. Представляется интересным изучить маркеры атерогенеза в различных клинических ситуациях, ассоциированных с атеросклерозом, а также исследовать возможность синтеза некоторых из этих белково-пептидных факторов нейтрофильными лейкоцитами и тем самым уточнить механизмы их участия в этом процессе.

Актуальной проблемой остается диагностика доклинических форм атеросклероза, активности и тяжести процессов формирования атеросклеротического поражения на основании изучения функциональной способности нейтрофилов и связанных с ними биомаркеров.

В настоящем исследовании предпринята попытка изучить роль нейтрофилов и синтезируемых ими факторов у больных ГБ, ИБС, ОААНК и сочетанным течением атеросклероза. Для этого решено исследовать ряд белковых

факторов и ЛВСЛ в супернатантах, полученных в ходе выделения, концентрирования и культивирования лейкоцитов по методике А.В. Туева и В.Ю. Мишланова. Выбор белково-пептидных факторов был обусловлен их способностью образовывать комплексы с холестерином и характеристикой их функции в организме. Представлялось интересным исследовать возможность выявления в лейкоцитарных супернатантах у больных ГБ и атеросклерозом различной локализации «классических» воспалительных белков (hs-СРБ), тромбофилических (VIIF, фактор Виллебранда (ФВ)), противомикробных (дефензины альфа) факторов, а также липидных проатерогенных маркеров (ЛПА) и протеинов, маркирующих повреждение клеток (NT-proBNP, белок связывающий жирные кислоты (БСЖК)).

Актуальной исследовательской задачей явилось изучение динамики ЛВСЛ, содержания белково-пептидных факторов в лейкоцитарных супернатантах и в сыворотке крови, а также ряда провоспалительных цитокинов (интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-8 (ИЛ-8) и фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа)) у больных атеросклерозом в качестве маркеров эффективности проводимой терапии статинами с учетом их потенциальной способности модулировать функциональную активность нейтрофилов [242,262].

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. Для достижения поставленной цели решались следующие исследовательские задачи.

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 характерных для больных ГБ, ИБС, ОААНК и сочетанным атеросклерозом. Показано, что у больных ГБ в лейкоцитарных супернатантах обнаруживаются высокие концентрации дефензинов альфа и NT-proBNP, в то

время как величина ЛВСЛ не отличается от здоровых лиц. Установлено, что в рамках сердечно-сосудистого континуума изменения белковой продукции 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 ФВ, а у больных ОААНК - ЛПа и hs-CРБ. Показано высокое содержание hs-CРБ в супернатантах в случае нестабильного характера атеросклеротических бляшек и проксимального типа поражения сосудистого русла. Выявлено, что сочетанное течение атеросклероза наиболее часто ассоциировано с повышенным содержанием в супернатантах дефензинов, hs-CРБ, 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 хронической сердечной недостаточности.

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

Впервые установлена взаимосвязь содержания дефензинов в сыворотке и супернатантах с показателями, отражающими структурные изменения сердца (КДО, конечный систолический объем (КСО), масса миокарда левого желудочка (ММЛЖ), тип ремоделирования), что подтверждает общность процессов ремоделирования сердечно-сосудистой системы и воспаления в рамках сердечно-сосудистого континуума.

Впервые установлено снижение величины ЛВСЛ, а также концентрации 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.

В ходе исследования раскрыто значение ЛВСЛ у больных различных клинических групп. Установлено, что величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л имеет среднюю разделительную эффективность (AUC-0,65) между больными ИБС и здоровыми лицами и хорошую (AUC-0,7) в случае пациентов с ОААНК. Показано, что величина ЛВСЛ более 0,18 ммоль/л может служить диагностическим критерием ИБС нестабильного течения (AUC-0,77). У пациентов с доклиническим атеросклерозом (пациенты с ГБ) величина ЛВСЛ значимо не отличается от значений здоровых лиц. Таким образом, ЛВСЛ можно рассматривать как наиболее эффективный маркер активности и тяжести атерогенеза. В аспекте ранней диагностики атеросклероза эффективность этого показателя низкая.

В результате проведенного научного исследования установлены новые дополнительные факторы риска и определены количественные значения этих показателей, свойственные больным атеросклерозом различных локализаций.

Показано, что у больных с доклиническим атеросклерозом (больные ГБ) точкой разделения от здоровых лиц были концентрация дефензинов в сыворотке крови более 1300 пг/мл (AUC – 0,98) и супернатанте более 210000 пг/мл (AUC – 0,72), а также NT-proBNP в супернатанте более 21 пг/мл (AUC – 0,72).

Установлена различная операционная значимость изучаемых показателей у больных ИБС и ОААНК. У больных ИБС концентрации дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах свыше 210000 пг/мл, NT-proBNP более 21 пг/мл, ФВ свыше 0,07 ЕД/мл, VIIф более 0,64 нг/мл имеют отличную разделительную (от здоровых лиц) эффективность, СРБ более 25,33 мкг/л – очень хорошую, а ЛПа свыше 28,23 нг/мл - хорошую. Содержание в сыворотке крови дефензинов-альфа более 1700 пг/мл, СРБ – более 3,91 мг/л и VIIф – выше 2,22 нг/мл рассматриваются как отличный разделительный критерий между больными ИБС и здоровыми лицами, концентрации NT-proBNP более 23,87 пг/мл и ИЛ-6 – выше 1,72 пг/мл - как очень хороший, а ИЛ-8 более 4,89 пг/мл – как средний. Для величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л получены средние операционные характеристики. У больных ОААНК отличную разделительную (от здоровых лиц)

эффективность показали значения концентрации ЛПа в лейкоцитарных супернатантах более 35,21 нг/мл (AUC- 0,97), хорошую - содержание дефензинов в сыворотке более 1300 пг/мл (AUC – 0,74) и величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л (AUC-0,65), а содержание СРБ в супернатантах более 19,5 мкг/л (AUC -0,69) – среднюю эффективность.

У больных ОААНК установлено, что концентрация СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л (AUC-0,95) ассоциирована с «нестабильным» характером атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий.

При разделении больных доклиническим атеросклерозом (больные ГБ) и клинически манифестным поражением коронарных артерий (больные ИБС) полезным оказалось выявление величины содержания дефензинов в супернатантах более 300214 пг/мл (AUC – 0,71) и ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л (AUC – 0,7).

На основании проведенного исследования предложены оптимальные алгоритмы обследования пациентов в различных клинических ситуациях.

В случае скрининга, проводимого у клинически здоровых лиц, для выявления ранних стадий атерогенеза целесообразно исследовать в лейкоцитарных супернатантах содержание дефензинов-альфа и NT-proBNP, а в сыворотке крови - концентрацию дефензинов-альфа. Превышение значений концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови более 1300 пг/мл, содержания дефензинов-альфа в супернатантах 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, 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, VIФ 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 в лейкоцитарных супернатантах ЛПА и СРБ, в сыворотке крови – дефензинов, а также величины ЛВСЛ. При превышении концентраций ЛПА в супернатантах более 35 нг/мл, СРБ - более 19,5 мкг/л, а в сыворотке дефензинов-альфа - более 1300 пг/мл и величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л пациентам может быть предложено обследование, верифицирующее атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей.

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

У больных с сочетанным течением атеросклероза показана эффективность терапии статинами, улучшающая как клинические исходы и модулирующая высвобождение липидов и ряда белков (СРБ и дефензины) 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 в лейкоцитарных супернатантах белков (СРБ, дефензинов) и ЛВСЛ может использоваться для контроля эффективности проводимой терапии.

Внедрение

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. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России. По результатам работы проведено патентование способа диагностики функционального класса ХСН [31] и способа оценки белоксинтезирующей функции лейкоцитов [30].

Личный вклад соискателя

Автором самостоятельно обозначена актуальная научная проблема, спланирован дизайн, поставлена цель и задачи исследования. Выполнено общеклиническое обследование, создана компьютерная база данных, проведена их статистическая обработка и анализ полученных результатов. В ходе выполнения работы разработаны и запатентованы две диагностические методики: способ диагностики функционального класса хронической сердечной недостаточности у больных стенокардией и способ оценки белокпродуцирующей функции лейкоцитов для клинических исследований [30,31].

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.

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 04.03.2015 (протокол №4).

По теме диссертации опубликовано 25 работ, в том числе 14 статей в журналах, рекомендованных ВАК, имеются 2 патента РФ на изобретение.

Связь работы с научными программами

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ГБОУ ВПО «ПГМУ им.акад. 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.

Диссертация представляет рукопись на русском языке объёмом 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, 1 протоколом.

ГЛАВА 1

ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Современное состояние изучения механизмов и факторов риска атеросклероза

1.1. Эпидемиология атеросклероза и ассоциированных с ним заболеваний

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной смерти у взрослых лиц, их доля в структуре летальности составляет от 40% до 58% всех смертей [120].. При этом, большинство случаев ССЗ связаны с атеросклерозом [7,42,93,121].

ИБС является широко распространенной и дорогостоящей нефункционной эпидемией западного мира. По данным национальных обследований и обсервационных когортных исследований в США распространенность ИБС среди лиц старше 20 лет-6,4% (7,9% среди мужчин и 5,1% среди женщин) [83]. 1 из 6 смертей в США обусловлена ИБС [121,205]. Ежегодная расчетная заболеваемость в США составляет 785000 случаев ИБС. Прямые и косвенные затраты государства, связанные с этим заболеванием, оцениваются в \$96 млрд. и \$81 млрд. соответственно [94].

Схожие эпидемиологические данные приводятся по распространенности ИБС в Европейском союзе, где порядка 6-7% населения имеют клинически выраженную ИБС [83,12].

В настоящее время распространенность ИБС в России составляет среди всего населения $13,5 \pm 0,1\%$, среди мужчин — $14,3 \pm 0,3\%$, среди женщин — $13,0 \pm 0,2\%$ [12]. Распространенность ИБС в нашей стране увеличивается с возрастом и составляет более 50% среди населения старше 70 лет [15].

Большинство эпидемиологических исследований для диагностики ОААНК использовали неинвазивные измерения ЛПИ. Распространенность ОААНК на

основе измерения ЛПИ колеблется примерно от 4% среди лиц от 40 до 65 лет и до 15 - 20% среди лиц старше 65 лет и старше. Частота выявления ОААНК выше у мужчин, чем у женщин. Показано, что только у 10-30% пациентов с ОААНК есть хромота. По оценкам американской статистической группы распространенность хромоты составляет от 1 до 4,5% у лиц старше 40 лет. Критическая ишемия нижних конечностей встречается в 400-450 случаев на миллион населения в год, при этом ампутация требуется от 112 до 250 случаев на миллион населения в год [44].

Тем не менее, несмотря на убедительные эпидемиологические данные по болезням, ассоциированным с атеросклерозом, истинная распространенность атеросклероза существенно превышает частоту его клинических проявлений. Так в исследовании «Bogalusa Heart Study» было проведено 204 аутопсии у лиц в возрасте от 2 до 39 лет, погибших в результате несчастного случая [35]. Липидные полосы в коронарных артериях были обнаружены у 50% лиц в возрасте от 2 до 15 лет, и у 85% лиц в возрасте от 26 до 39 лет. [235]. Схожие результаты выявлялись при проведении аутопсий у американских солдат, погибших в ходе корейской, вьетнамской, иракской и афганских войн [58].

По данным последних исследований у 7 - 10% мужчин и 5 - 7% женщин старше 65 лет имеется бессимптомный стеноз сонных артерий более чем на 50% [58]. Представляются интересными результаты прижизненного исследования коронарных сосудов 262 реципиентов после трансплантации сосудов от практически здоровых доноров с помощью внутрисосудистого ультразвукового сканирования [58]. Предварительно у 97% доноров среднего возраста 37 лет по результатам ангиографического исследования исключалось наличие атеросклероза. Однако у значительной их части с помощью ультразвукового исследования обнаружено увеличение толщины интимальной оболочки более 0,5 мм [192]. В возрасте до 20 лет подобные поражения обнаружены в 17% случаев, от 20 до 29 лет – в 37%, от 30 до 39 лет – в 60%, от 40 до 49 лет – в 71%, и в возрасте старше 50 – у 85% доноров [251]. Таким образом, истинная распространенность атеросклероза, как патоморфологического процесса, у лиц

старше 50 лет стремится к 100%, а его клинические проявления, по всей видимости, зависят от фоновых заболеваний, таких как, артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет (СД) и ряда других состояний, потенцирующих клинические проблемы [112,251]. Приведенные данные иллюстрируют необходимость поиска новых методов ранней диагностики, профилактики и прогнозирования осложнений, ассоциированных с атеросклерозом заболеваний.

1.2. Теории и гипотезы атерогенеза

Исследования, направленные на поиск новых маркеров атерогенеза, тесно связаны с изучением его фундаментальной сущности, которая, несмотря на длительный срок изучения, до сих пор не ясна.

1.2.1. Гипотеза «реакция на повреждение». Среди многих гипотез развития атеросклероза вплоть до начала 21 века наиболее универсальной считалась «реакция на повреждение», зародившаяся в 19 веке и претерпевшая современные модификации [210]. Согласно этой концепции развитие атеросклеротического процесса является реакцией сосудистой стенки на повреждение. В частности, долгое время бытовали представления [209], что в ответ на нарушение целостности эндотелиального покрова происходит адгезия тромбоцитов к участкам повреждения сосудистой стенки и выброс ими специфического фактора роста (PDGF) [209,241]. В результате поступления PDGF в ткань сосудистой стенки происходит миграция гладкомышечных клеток из средней оболочки в интиму, их размножение и модификация с изменением фенотипа [209]. Модификация гладкомышечных клеток сопровождается секрецией белков внеклеточного матрикса, что приводит к формированию фиброзной покрышки бляшки [46,188].

Однако эта гипотеза не объясняет динамику развития атеросклеротической бляшки. Оказалось, что в неизмененных участках интимы крупных артерий человека содержится большое количество мезенхимальных клеток, способных к синтезу и секреции белков внеклеточного матрикса [236], что не приводит к формированию бляшек. Кроме того, в местах развития атеросклеротических бляшек артерий человека увеличение численности так называемых

«модифицированных гладкомышечных» клеток не столь значительно, как этого можно ожидать, исходя из концепции «реакция на повреждение» [169]. Было показано, что основной причиной избыточного скопления коллагена и других белков внеклеточного матрикса является возрастание секреторной активности присутствующих в интиме мезенхимальных клеток, а не гладкомышечных клеток [237].

Спорным остается вопрос - насколько опыты с деэндотелизацией стенки артерии служат адекватными моделями атерогенеза, подтверждающими данную гипотезу [237]. До настоящего времени отсутствуют экспериментальные и аутопсийные данные, которые показали бы наличие повреждений эндотелия в участках сосудистой стенки, еще не подвергнувшись атеросклеротическому процессу. Необходимо учитывать, что при всех способах искусственного повреждения эндотелиального монослоя имеет место не только нарушение его структуры, но также и субэндотелиального слоя интимы [230].

Концепция «реакция на повреждение» оказалась полезной в плане понимания роли эндотелия в развитии атеросклеротического поражения. Эндотелиальная дисфункция, которая характеризуется дисбалансом между факторами констрикции и релаксации, прокоагулянтными и антикоагулянтными молекулами, провоспалительными и противовоспалительными субстанциями, играет существенную роль в атерогенезе [191].

Эндотелиальные клетки индуцируют адгезию путем экспрессии специфических молекул (селектинов, интегринов), которые взаимодействуют с лигандами на лейкоцитах и тромбоцитах [191]. Экспрессия молекул адгезии увеличивается в эндотелиальных клетках, которые подвергаются хроническому повреждению факторами риска атеросклероза. При этом не обязателен факт деэндотелизации сосудистой стенки. Показано, что изменения в потоке крови около сосудистой стенки от нескольких минут до нескольких часов вызывают адаптивные ответы, которые кратковременно повышают проницаемость эндотелия [210].

Барьерная функция эндотелия и его проницаемость регулируется силой растяжения сосуда и сдвига напряжения [210]. Рост поглощения макромолекул сосудистой стенкой имеет место, когда эндотелий приспосабливается к изменениям в гемодинамическом и химическом окружении [206]. На экспериментальной модели показано, что проницаемость эндотелия для ЛПНП увеличивается в 2,6 раза одновременно с повышением внутриартериального давления [117,191]. Из сказанного выше следует, что АГ способствует увеличению проницаемости эндотелия и накоплению липопротеидов в интиме. Атеросклеротические поражения формируются в местах разветвления сосудов, где сдвиг поверхностного напряжения находится в диапазоне от 1 до 3 Дин/см² [230]. Участками стенки артерий, максимально предрасположенными к атеросклерозу, являются зоны с минимальной плотностью клеток (300-500 клеток на мм²) при плотности 2000-2500 клеток на мм² в других зонах [122, 34].

Продемонстрировано, что ослабление контактов между эндотелиальными клетками во время их деления, обеспечивают пути, через которые липопротеиды низкой плотности входят и накапливаются в субэндотелиальном пространстве [122]. С другой стороны, умирающие эндотелиальные клетки, подвергшиеся апоптозу также способствуют фокальному увеличению проницаемости [199].

Рядом исследователей выявлено, что содержание гигантских многоядерных эндотелиальных клеток значительно возрастает как с увеличением возраста, так и с развитием атеросклеротических поражений [206]. Оказалось, что в макроскопически нормальных сосудах молодых лиц кластеризованный тип организации эндотелия выявляется практически только в зонах высокой предрасположенности к атеросклерозу, а у больных атеросклерозом данный тип эндотелия покрывает более протяженные участки и иногда обнаруживается даже в зонах низкой предрасположенности к образованию атеросклеротических бляшек [206].

Резюмируя приведенные выше данные, можно констатировать, что морфофункциональное состояние эндотелия во многом определяет избирательность атеросклеротического поражения [216].

1.2.2. Воспалительная теория атерогенеза. В последнее время все больше оснований рассматривать атеросклероз, как сложный процесс, которому предшествует и который сопровождает **воспаление**. Первоначально повреждение провоцирует эндотелиальные клетки к экспрессии молекул клеточной адгезии, таких как интерлейкин 1(ИЛ-1), ФНО-альфа, хемокины (MCP-1, ИЛ-8) и факторы роста, например, PDGF [139]. Это приводит к адгезии моноцитов и Т-лимфоцитов к эндотелию, последующей их миграции в субэндотелиальный слой. Большинство моноцитов превращаются в макрофаги и захватывают модифицированные, более атерогенные чем нативные, ЛПНП. В последующем эти клетки становятся «пенистыми» [138].

Воспаление изменяет реакцию эндотелия на ангиотензин II, что приводит к вазоконстрикции, а также индуцирует протромбогенное состояние, активируя тромбоциты и факторы свертывания крови [209]. Реакция эндотелия на повреждение заключается в защитном ответе воспалительного характера, который приводит к образованию атеросклеротической бляшки [46]. Выделяющиеся цитокины усиливают иммунный ответ, изменяют функцию эндотелиальных клеток в протромбогенном направлении, которое характеризуется повышением продукции PAI-1, а также активацией системы коагуляции и высвобождением PDGF [158]. Эндотелиальная дисфункция при атеросклерозе характеризуется повышенной проницаемостью эндотелия, экспансией эндотелиальных молекул клеточной адгезии, а также миграцией лейкоцитов в артериальную стенку [157].

Перегруженные липидами пенистые клетки разрушаются и гибнут, формируя липидное ядро бляшки. Миграция гладкомышечных клеток в интиму и синтез ими волокон колагена приводят к образованию защитной фиброзной покрышки над липидным ядром. Стабильная атеросклеротическая бляшка характеризуется наличием толстой фиброзной покрышки, содержащей много гладкомышечных клеток. При этом рост бляшки преимущественно осуществляется в плечевых участках за счет продолжающейся адгезии лейкоцитов [209].

Формирование эрозии бляшки или разрыв покрышки характеризуют ее нестабильность. Факторами, которые могут вызывать нестабильность бляшки, являются артериальная гипертония, высокая турбулентность потока крови, повышенный уровень воспалительных клеток, большое липидное ядро и тонкая фиброзная покрышка с малым количеством гладкомышечных клеток или коллагеновых волокон. Как эрозия, так и разрыв покрышки могут привести к образованию тромба на месте бляшки и окклюзии сосуда [138].

Формирование матрикса бляшки зависит от баланса продуктов синтеза и распада в фиброзной покрышке, особенно в плечевых участках. В нестабильной фиброзной покрышке активированные Т-лимфоциты выделяют гамма интерферон (ИФН-гамма), снижая тем самым образование коллагена и активируя металлопротеиназы. Активация макрофагов такими факторами, как ИФН-гамма, ИЛ-1, ФНО-альфа, MCP-1 и моноцитарный колонии стимулирующий фактор (M-CSF), приводит к повышению продуктивности коллагеназы, желатиназы, стромелизина и других протеаз и пептидаз, которые разрушают коллаген или ограничивают его образование в фиброзной покрышке [138,157,158,209].

Имеются косвенные доказательства того, что при ряде хронических воспалительных заболеваний, таких, как ревматоидный артрит и псориаз, длительное воспаление ассоциируется с сосудистыми событиями [200]. В частности, для больных ревматоидным артритом и псориазом показано, что лица с более активными и агрессивными формами болезни действительно имеют самый высокий риск неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Недавно в мета-анализе показано, что ИЛ-6 является «связующим мостом» воспаления и атеросклероза [283]. Другим возможным кандидатом является ИЛ-1 β . Доклинические данные показывают, что ИЛ-1 β является одним из самых мощных провоспалительных сосудистых цитокинов. В данный момент проводится первое клиническое рандомизированное исследование, оценивающее эффективность воспалительной концепции атеросклероза [200], в ходе которого будет оценена эффективность антицитокиновой терапии для вторичной профилактики у пациентов высокого риска по сосудистым событиям [200].

Завершившееся в 2012 году исследование genome-wide association studies (GWASs) предоставило внушительный объем информации, относящейся к множеству биологических путей прогрессирования атеросклероза [170]. Хотя атеросклероз представляет собой сложный процесс, результаты исследования GWASs подтверждают гипотезу о том, что провоспалительные пути с участием, как врожденного, так и адаптивного иммунитета, играют причинную роль в поражении коронарных артерий. При этом выявлено несколько генных локусов, определяющих связь атеросклероза и воспаления [170].

Имеются данные, что определенные инфекционные агенты, в связи с особенностью их белково-липидных оболочек, обладают повышенным сродством к эндотелию сосудов, а также способностью изменять липидный спектр крови [156,283]. Не являясь причиной развития атеросклероза, они могут поддерживать в организме хроническое воспаление, на фоне которого атеросклеротический процесс и его клинические проявления реализуются наиболее выражено. Этим, по всей вероятности, и ограничивается неспецифическая роль при атеросклерозе таких инфекционных агентов, как *S.pneumoniae*, цитомегаловирус, *Helicobacter pylori* [36].

В последние годы большое внимание уделяется изучению врожденной иммунной системы, одной из функций которой является активация экспрессии белков на антигенпрезентирующих клетках. Показано, что большинство адьювантов, имитируя микробную инфекцию, иницируют рецепторы врожденной иммунной системы и вызывают выделение конституциональных белков. Ключевую роль в защите от микроорганизмов играют Толл-подобные рецепторы (TLR) [221]. Исследования наглядно демонстрируют значение TLR2 и TLR4 в развитии атеросклеротического поражения [225]. Отмечено, что по химической структуре большинство бактериальных антигенов являются липопротеинами, поэтому развитие иммунного воспаления в ответ на накопление модифицированных собственных липопротеинов является защитной реакцией организма, первоначально направленной на элиминацию патогенных микроорганизмов [45].

В отличие от острого инфекционного процесса воспалительный ответ, возникающий в ходе атерогенеза носит хронический, самоподдерживающийся характер. Это связано с рядом механизмов, открытых достаточно недавно. Во-первых, в этой связи можно упомянуть механизм повторной стимуляции TLR2 и TLR4 [221]. Во-вторых, обнаружена тесная связь между дефектами митохондриального генома (митохондриальными мутациями) и атеросклерозом [231,232]. Дефектную митохондрию клетка может воспринимать не только как органеллу, от которой надо избавиться путем митофагии, но и ошибочно, как патоген бактериальной природы. Не будучи способной избавиться от «патогена», клетка инициирует реакцию врожденного иммунитета в режиме нон-стоп, пока не будет уничтожена другими иммунокомпетентными клетками [232]. В третьих, показано, что микроРНК (miRNAs), являющаяся важным регулятором экспрессии генов на этапе посттранскрипционных изменений клеточных реакций, участвует в развитии нескольких сосудистых патологий, в том числе и атерогенезе. При этом, значимость этого механизма возрастает с возрастом [71].

Достаточно интересными представляются данные о клеточном составе тканей в местах атеросклеротического поражения. Показано, что в атеросклеротических поражениях происходит увеличение количества как оседлых, так и гематогенных клеток. Причем в количественном отношении доля гематогенных клеток увеличивается значительно (в 8 раз в атеросклеротических поражениях по сравнению с непораженной интимой), чем оседлых (количество клеток увеличивается только в 3 раза). Однако даже при таком резком увеличении численности гематогенных клетки в атеросклеротических поражениях они не становятся преобладающим клеточным типом и доля их не превышает 20% клеточной популяции [187]. Представляет интерес рассмотрение роли отдельных клеток в процессе атерогенеза.

1.3. Роль лейкоцитов в атерогенезе

Известно, что хронически повышенный уровень лейкоцитов связан с увеличением долгосрочного риска ишемического инсульта, инфаркта миокарда или сосудистой смерти [55]. Даже пограничные уровни лейкоцитов у больных с

отягощенным сосудистым анамнезом коррелируют с повышенным риском развития ишемических сосудистых событий [55,97,274]. Миграция лейкоцитов в стенку артериального сосуда является первым шагом в развитии атеросклеротического поражения. Взаимодействия селектинов с их лигандами медирует привлечение и направленное движение лейкоцитов к сосудистой стенке, тогда, как взаимодействие иммуноглобулинов с лейкоцитарными интегринами обуславливает адгезию и миграцию лейкоцитов через эндотелий [167,267].

Тканевые макрофаги отличаются от циркулирующих в крови и в очаге ведут себя по-разному. Так макрофаги, находящиеся вблизи поврежденных покрышек атеросклеротических бляшек и в их некротических ядрах, экспрессируют высокий уровень прокоагуляционного тканевого фактора, а макрофаги в «плечах» атеросклеротических поражений производят ферменты - миелопероксидазу и нейтрофильную эластазу. Кроме того, макрофаги в развитых человеческих атеромах экспрессируют высокий уровень проатерогенного аполиipoproteина E (apoE) [158,278].

В атеросклеротических бляшках различные типы клеток, в том числе макрофаги и ГМК могут генерировать микрочастицы (MPs). MPs являются большими внеклеточными везикулами (диаметр от 50 нм до 1000 нм), окруженными фосфолипидным бислоем. Эти везикулы выделяются в межклеточное пространство путем прямого отпочковывания от плазматической мембраны клеток. У здоровых лиц лейкоцит-производные везикулы (LMPs) представляют собой незначительную часть (<10%) от общей массы MPs в крови [119]. Плазменные уровни LMPs значительно увеличиваются у пациентов с сердечно-сосудистыми и метаболическими расстройствами, в том числе при атеросклерозе, венозной тромбоземболии в анамнезе, артериальной гипертензии и сахарном диабете [188]. LMPs содержат провоспалительные молекулы (напр., интерлейкин 1 β , CD40 лиганд) и могут усиливать атерогенность среды. Помимо этого, они стимулируют пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез (при посредничестве CD40 лиганда), повышают моноцитарную адгезию и миграцию

путем предоставления молекул межклеточной адгезии (ICAM)-1, а также вызывают нестабильность покрышки атеросклеротической бляшки за счет различных протеолитических ферментов (матриксная металлопротеиназа [ММП]) [30].

Макрофаги в атеросклеротических бляшках производят около 60% LMPs [196]. Ранее считалось, что макрофаги и «пенистые» клетки генерируют LMPs в ходе апоптоза. Однако недавние исследования показали, что живые моноциты/макрофаги выделяют LMPs после активации различными раздражителями, в том числе липополисахаридами, табаком, холестерином липопротеинов высокой плотности [154,159,196,197,267,278]. Предполагается, что моноциты-макрофаги поглощают и катаболизируют белки, а затем экспрессируют на своей поверхности их короткие пептидные фрагменты, которые при участии белков активации, осуществляющих рецепторное связывание, передаются Т-лимфоцитам [105].

1.3.1. Роль нейтрофилов в атерогенезе.

Значительные усилия предприняты для выяснения роли моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов в атерогенезе от его начальных этапов и до развития тромботических осложнений [59]. Напротив, роль ПМН в развитии атеросклероза до недавнего времени изучалась недостаточно [232,271] в связи с тем, что нейтрофильные инфильтраты редко обнаруживались в атеросклеротических бляшках по сравнению с другими воспалительными клетками. Данная ситуация может быть связана с ограниченной продолжительностью жизни нейтрофилов в воспаленных тканях. В этом случае, даже небольшое их число в гистологических срезах может свидетельствовать о значительных процессах миграции в область атеросклеротической бляшки *in vivo*. ПМН играют важную роль в воспалении в связи с их способностью выполнять ряд эффекторных функций, которые в совокупности представляют собой основной механизм врожденного иммунитета [75]. Большинство из этих функций зависит от мобилизации цитоплазматических гранул и секреторных везикул, которые являются важным резервуаром не только антибактериальных белков,

протеаз и оксидаз, но и широкого спектра связанных с мембраной рецепторов к эндотелиальным молекулам адгезии, внеклеточных матриксных протеинов и растворимых медиаторов воспаления [33], которые вовлечены в патогенез атеросклероза.

Вопреки давней и широко распространенной мысли, что роль нейтрофилов малоактуальна в рамках атерогенеза, доказательства из биологии нейтрофилов и проведенные исследования воспалительных и инфекционных заболеваний наводят на мысль, что эти клетки вносят важный вклад в патогенез атеросклероза и его осложнений, поскольку они способны воспринимать сигналы из внешней среды для выполнения иммунных программ, которые играют важную роль в деле координации воспалительного ответа и его разрешения. Центральным элементом этих программ является способность нейтрофилов тесно общаться с соседними иммунными и неиммунными клетками (такими, как моноциты/макрофаги, Т-лимфоциты, дендритные клетки, эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки) через высвобождение различных медиаторов и прямых контактных факторов [43].

Нейтрофилы являются первыми лейкоцитами, проникающими в воспаленные ткани. Ранний приток нейтрофилов был описан в нескольких экспериментальных моделях повреждения сосудов, в том числе эндотоксин-индуцированного повреждения, высушивания, трансмуральной электрической стимуляции, транслюминальной травмы [166]. Инфильтрация нейтрофилами сосудистой стенки была обнаружена на 4 день после того, как накладывали воротник на сонные артерии мышей, дефицитных по аполипопротеину E. В этом исследовании выведена особая роль нейтрофилов в дестабилизации бляшки [190].

Van Leeuwen et al. описал участие нейтрофилов в начальных и продвинутых стадиях развития атеросклеротического поражения у мышей, дефицитных по рецепторам к ЛПНП [258]. Это исследование показало, что нейтрофильная инфильтрация не ограничивается поражением в ответ на сосудистые манипуляции, но также возникает в процессе спонтанного атерогенеза [258]. Интересно, что van Leeuwen et al. наблюдали присутствие нейтрофилов не только

в очаге атеросклеротического поражения, но и в адвентициальном слое. Они предположили, что миграция воспалительных клеток через адвентицию может играть определенную роль в формировании сосудистого воспаления [258].

Zernecke et al. показали, что мобилизация нейтрофилов из периферической крови и их миграция в сосудистую стенку вносят вклад в прогрессирование атеросклеротического поражения [282]. В этом важном исследовании мышам, дефицитным по apoE, находящимся на атерогенной диете, вводили в течение 4 недель антиполиморфноядерные лейкоцитарные антитела (анти-ПМН Ab), что позволило снизить циркуляцию нейтрофилов в периферической крови без воздействия на количество моноцитов. Лечение с антинейтрофильными антителами нарушало формирование бляшек в корне аорты, демонстрируя, что нейтрофилы стимулируют атерогенез в данной животной модели. Zernecke et al. установлено, что нейтрофильное истощение на фоне проводимой терапии препятствовало дестабилизации течения атеросклероза после хронической блокады хемокинового рецептора 4 (CXCR4) [282].

На модели с кроликами, которым накладывали периваскулярные муфты на сонные артерии показано, что развитию неинтимы предшествует двухфазный воспалительный ответ. Первая фаза состояла в формировании сосудистого инфильтрата из ПМН, которая начиналась почти сразу, достигала максимума через 24 ч и быстро исчезала после миграции моноцитов (вторая фаза реакции) [74]. Эта экспериментальная модель продемонстрировала возникновение контакта между ПМН и гладкомышечными клетками (ГМК) [408], основанного на феномене интернализации, когда жизнеспособные клетки-мишени включаются в другие клетки-хозяина без явлений фагоцитоза [282].

Выявлено, что нейтрофилы в процессе атерогенеза проникают в артерии, где их непродолжительный срок службы продлевается воспалительными цитокинами. Нейтрофилы способны легко проникать из кровотока внутрь сосудистой стенки вблизи фиброзной капсулы [117]. В ходе воспалительной реакции они приобретают более жесткий каркас, перекрывая просвет малых сосудов, что может способствовать ишемии миокарда [221]. Суждение о частоте

встречаемости нейтрофилов в сосудистой стенке может быть ошибочным из-за короткой продолжительности жизни нейтрофилов, оцениваемой в среднем в 5,4 дня [107]. После проникновения в область воспаления нейтрофилы, в конечном счете, подвергаются апоптозу, а резидентные макрофаги быстро их фагоцитируют [107]. Локальное разрушение нейтрофилов является функциональным, усиливает антимикробную способность макрофагов посредством приобретения и использования ими нейтрофильных антимикробных молекул [282]. Многие авторы считают, что роль нейтрофилов может быть лучше понята при изучении их биохимических «следов» собственно в очагах воспаления и в отдаленных от них тканях [125,182].

Указанные выше экспериментальные данные согласуются с результатами большого количества клинико-эпидемиологических исследований на протяжении более чем двух десятилетий [75]. Была зафиксирована взаимосвязь между повышенным уровнем циркулирующих лейкоцитов и увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний [33]. Наибольшая предсказательная способность среди всех лейкоцитов характерна для ПМН [33]. В соответствии с этими наблюдениями увеличение уровня циркулирующих провоспалительных цитокинов, происходящее у больных ИБС, коррелирует с количеством периферических нейтрофилов [75]. Ангиографические исследования у больных со стабильной стенокардией или острым коронарным синдромом показали, что уровень нейтрофилов был независимым предиктором наличия нескольких сложных стенозов [274]. В ряде клинических исследований продемонстрирована существенная активация нейтрофилов у больных с нестабильной стенокардией или инфарктом миокарда [28]. Показано, что активация циркулирующих нейтрофилов при ряде заболеваний (АГ, СД 2 типа, дислипидемия, обструктивное апное сна, ожирение и др.) связана с высоким риском развития атеросклероза [33,272].

Сравнительный анализ показателя количества нейтрофилов и hs-СРБ, который является наиболее часто измеряемым воспалительным маркером при

сердечно-сосудистых заболеваниях, показал, что уровень нейтрофилов - более надежный предиктор сосудистых событий в данной популяции. [278].

Гистологические наблюдения выявили, что нейтрофилы играют важную роль при остром коронарном синдроме. Было показано наличие нейтрофилов в атеросклеротических бляшках пораженных коронарных артерий, полученных при аутопсии у пациентов с острым инфарктом миокарда (ИМ) и при атерэктомии у пациентов с нестабильной стенокардией [243]. В этом исследовании во всех случаях наблюдения у больных ИБС в пределах бляшки обнаруживались нейтрофилы, в то время, как эти клетки были чрезвычайно редкой находкой в коронарных артериях, полученных от пациентов, умерших не от сердечно-сосудистых заболеваний. Количество нейтрофилов, обнаруженных у пациентов с нестабильной стенокардией, было значительно выше, чем в группе больных со стабильным течением заболевания. Гистологический анализ образцов, полученных при каротидной эндартерэктомии, показал, что нейтрофильная инфильтрация способствует выделению протеаз, которые способствовали разрушению покрышки бляшек и кровоизлиянию в них [105].

В течение последнего десятилетия получены новые данные, указывающие на то, что ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А редуктазы (или статины) обладают способностью модулировать активность нейтрофильного воспаления [262]. Sugano et al в клинических условиях показали, что *ex vivo* эндотелиальная адгезивность ПМН, полученных от лиц с гиперхолестеринемией, была выраженной по сравнению с контролем и ослабевала через 3 месяца лечения флувастатином (20 мг/день) вне зависимости от его липидкорректирующего эффекта [242]. Ван Осторн et al. установили, что лечение розувастатином (20 мг/день в течение 1 месяца, затем по 40 мг/сут в течение еще 1 месяца) уменьшает миграцию нейтрофилов у пациентов с умеренной гиперлипидемией и ранним началом ИБС, что также не было связано с улучшением метаболизма липопротеинов [262].

Апобелки липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), как было показано, играют важную роль в регуляции функции нейтрофилов в процессе

воспалительной реакции. In vitro apoAI подавляет иммуноглобулин G-опосредованную дегрануляцию нейтрофилов и продукцию супероксида [121]. Подобным образом ApoAII может уменьшить окислительный взрыв стимулированных нейтрофилов [121], а Apo-AI ингибирует адгезию активированных нейтрофилов к фибронектину и их дегрануляцию [156].

1.3.2. Липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных атеросклерозом.

В 2002 г. была предложена методика оценки ЛВСЛ in vitro у больных ИБС и другими заболеваниями [10]. Показано, что лейкоциты венозной крови больных ИБС обладают повышенной способностью к высвобождению белково-липидных комплексов при культивировании в неполной питательной среде в условиях тесного межклеточного контакта [22]. Методика основана на предварительном выделении из венозной крови лейкоцитов путем отстаивания в декстрозе, последующем центрифугировании и концентрировании клеточной суспензии до 50000 клеток на 1 мкл среды, культивировании в условиях метаболического стресса в течение 72 часов с дальнейшим определением в клеточном супернатанте концентрации холестерина холестериноксидазным методом. В выделенной таким образом клеточной суспензии преобладающим типом клеток были нейтрофилы (около 80%). Через трое суток средняя относительная величина количества нейтрофилов составила $26,3 \pm 4,5\%$, лимфоцитов – $62,7 \pm 5,6\%$, что свидетельствует о гибели нейтрофилов в процессе культивирования. Проведенный корреляционный анализ показал, что между способностью нейтрофилов выживать в условиях культивирования и высвобождением белково-липидных комплексов существует прямая умеренной силы связь ($R=0,49$, $p<0,02$).

Предпосылки для создания данной методики были следующие. Во-первых, ряд исследователей установил, что одной из причин внутриклеточного накопления липидов может быть нарушение их клеточного метаболизма. В клетках, культивируемых из атеросклеротических поражений, в том числе и лейкоцитах, скорость синтеза основных классов липидов выше, чем в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека [187]. Во-вторых, с

помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что все клетки субэндотелиального слоя интимы соединены в вертикальном и горизонтальном направлении в единую сеть [199]. Было предположено, что функции клеток, играющих ключевую роль в атерогенезе, зависят от степени контактной коммуникации между ними и эта зависимость имеет параболический характер [199]. Во время инфильтрации интимы лейкоцитами между клетками образуются наиболее тесные контакты, количество которых коррелирует с их синтетической активностью. В третьих, существует мнение, что накопление липидов клетками сопровождается другими атерогенными проявлениями, в частности, усилением пролиферации клеток и стимуляцией синтеза соединительнотканного матрикса [187].

На основании данных теоретических воззрений было предложено смоделировать процесс инфильтрации интимы лейкоцитами *in vitro*. Методика ЛВСЛ представляет собой индивидуальную модель атерогенеза. В результате проводимых в дальнейшем исследований было выявлено, что увеличение данного показателя более 0,15 ммоль/л сочетается с нестабильным течением ИБС [14]. У больных атеротромботическим типом ишемического инсульта в лейкоцитарных супернатантах обнаружен апопротеин (а) и СРБ, которые принимают активное участие в развитии системного воспаления и атерогенезе [2]. В 2011г. Бурцевой Т.В. показано увеличение ЛВСЛ у больных ИБС по мере нарастания функционального класса стенокардии и хронической сердечной недостаточности, получена прямая корреляционная связь значения ЛВСЛ и концентрацией мозгового натрийуретического пептида в сыворотке крови [5]. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано стимулирующее влияние ИЛ 1 и интерлейкина 2 (ИЛ-2) на высвобождение белково-липидных комплексов нейтрофилами у больных ишемической болезнью сердца. [1,2,14].

1.4. Новые факторы риска атеросклероза.

Первичная профилактика атеросклероза, основанная на обнаружении и лечении традиционных факторов риска, имеет решающее значение в предотвращении ряда фатальных событий, таких, как ИМ, мозговой инсульт (МИ), сосудистая смерть. Однако, несмотря на наличие различных глобальных шкал бальной оценки рисков, таких, как Framingham Risk Score, PROCAM и Европейского общества кардиологов [32,35,255], прогнозирование сердечно-сосудистых событий является недостаточно точным и значительное число пациентов групп риска остаются не выявленными на основе оценки традиционных факторов риска. Это побудило искать новые маркеры риска сердечно-сосудистых заболеваний [121].

Проведено значительное количество исследований, посвященных изучению «новых» биомаркеров, имеющих отношение к патогенезу атеросклероза, например, маркеров коагуляционного каскада (фибриноген [66], PAI-1[66], маркеры агрегации тромбоцитов [234], VIIф [85]) и липидных факторов (ЛПв [183], аполипопротеин В и мелкие плотные ЛПНП [183]). В качестве маркеров, изучены показатели, характеризующие гемодинамический стресс (NT-proBNP) [284], а также маркеры хронической воспалительной реакции такие, как hs- СРБ [44] и чувствительные маркеры повреждения миокарда, которые уже оказались полезными в диагностике ОКС (высокочувствительные тропонины Т или I, белок связывающий жирные кислоты) [51,186].

1.5. Значение ряда белковых факторов в развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

1.5.1. СРБ. Наиболее исследована ассоциация белков острой фазы с атеросклерозом. Самая убедительная доказательная база имеется по СРБ [36].

СРБ - высокочувствительный системный маркер воспаления и повреждения тканей. Он принадлежит к семейству пентраксинов и состоит из пяти одинаковых гликозилированных полипептидных доменов [37]. СРБ назван так ввиду его способности связывать кальций-зависимым способом С-полисахарид *Streptococcus pneumoniae*. В основном СРБ производится гепатоцитами, однако

обнаружен его синтез моноцитами/макрофагами, эндотелиальными клетками, ГМК, фибробластами, а также сердечными миоцитами под воздействием гипоксического стресса [50]. Стимуляция синтеза СРБ может осуществляться не только ИЛ-6, но и другими цитокинами (ИЛ-1 β , онкостатином М, тромбоцитарным фактором роста, ФНО-альфа) [280].

В острой фазе воспалительной реакции, в том числе, в случае инфекции или обширного повреждения тканей СРБ повышается в 10 000 раз в течение 6 ч и достигает максимума через 48 ч. Период его полураспада является постоянной величиной и составляет примерно 19 ч; поэтому его уровень во многом определяется степенью печеночного производства [71]. Ген, ответственный за его синтез, располагается на проксимальном отделе длинного плеча хромосомы 1. Значительная связь между генотипом и концентрацией СРБ подтверждена документально [139]. СРБ связывается с фосфохолиновыми остатками, присутствующими на поверхности микробов и другими аутологическими и внешними лигандами, такими как нативные и модифицированные липопротеины плазмы, поврежденные клеточные мембраны, различные фосфолипиды и апоптотические клетки. Это способствует связыванию антигенов и усиливает фагоцитоз. Считают, что патогенетическое значение СРБ, как и большинства цитокинов, реализуется посредством активации ядерного фактора κB (NF κB) [77,139], который является важным фактором транскрипции и участвует в активации специфических провоспалительных генов и в механизмах апоптоза клетки [139].

Точная роль СРБ *in vivo* не совсем понятна. До сих пор продолжают дебаты о роли СРБ. Непосредственно в атерогенезе его вклад в атерогенез показан на ряде животных моделей. Установлено, что СРБ причастен к уменьшению активности эндотелиальной синтазы оксида азота [139], увеличению окисления ЛПНП. В целом СРБ оказывает отрицательное влияние на функцию эндотелия и повышает ангиотензин II-индуцированные провоспалительные эффекты [50]. Показано снижение количества и функциональной активности эндотелиальных прогениторных клеток путем стимулирования апоптоза и снижения их миграции.

Выявлено, что СРБ обладает протромботическим потенциалом за счет стимуляции тканевого фактора (ТФ) высвобождаемого из мононуклеарных эндотелиальных клеток и ГМК, а также усиливает активность PAI-1 с сопутствующим ингибированием тканевого типа активатора плазминогена (t-PA). В результате снижается активность фибринолиза [214]. Выявлено, что СРБ увеличивает синтез ММП с последовательным увеличением деградации коллагена и числа моноцитов-макрофагов. СРБ активирует систему комплемента, что приводит к значительному увеличению размера инфаркта миокарда в различных моделях, в том числе у человека [214]. На линиях апопротеин Е-дефицитных мышей показано непосредственное участие СРБ в развитии атеросклероза. Доказано, что СРБ может принимать участие в поглощении ЛПНП макрофагами и превращении их в «пенистые» клетки [203].

Хотя, некоторые из перечисленных выше результатов экспериментальных исследований свидетельствуют о роли СРБ в атерогенезе, продолжается спор относительно их достоверности. Один из важнейших аргументов состоит в том, что большинство экспериментальных данных, полученных с СРБ, могут быть следствием микробной контаминации. Несколько тщательно спланированных, контролируемых экспериментов показали, что СРБ является важным фактором атерогенеза. Так Devaraj et al. и Singh et al. установили, что тепловая денатурация СРБ отменяла проатерогенные эффекты этого белка [214]. VISOENDIAL et al. выявили, что раствор СРБ индуцирует воспаление и активирует свертываемость крови человека [36]. Они также показали, что небольшие количества эндотоксинов, которые могут присутствовать в рекомбинантном человеческом СРБ, не способствуют проатерогенным эффектам. В ходе GWAS исследования выявлены генетические варианты гена СРБ, связанные с 20% -м снижением его уровня. Систематический обзор 35 обсервационных исследований показал, что для такого снижения уровня СРБ риск ИБС будет уменьшен на 6%. Однако, окончательных доказательств роли СРБ в атерогенезе до сих пор недостаточно из-за отсутствия адекватных моделей на животных и прямого интервенционного исследования в организме человека [214].

Еще в 1997 году Ridker et al. продемонстрирована тесная взаимосвязь между повышенным уровнем hs-СРБ и сердечно-сосудистыми событиями в Physicians' Health Study [200]. В большом исследовании ULSAM авторы показали, что даже в присутствии других надежных биомаркеров, таких как тропонин I, NT-NT-proBNP и цистатин С, высокочувствительный СРБ (hs-СРБ) был независимым предиктором основных фатальных сердечно-сосудистых событий и общей смертности [224]. В другом исследовании, Меландер et al. установили очень малую добавочную ценность любых новых исследуемых биомаркеров, включая hs-СРБ [178]. При этом, был опубликован еще один мета-анализ, оценивающий факторы риска содружественно в многофакторном аспекте на основе индивидуальных данных пациента, которые учитывали возраст, пол, классические факторы риска, такие как систолическое артериальное давление, курение, диабет, индекс массы тела, уровень триглицеридов, ЛПВП и ЛПНП, алкоголь и hs-СРБ. СРБ оказался независимым предиктором сосудистых исходов, даже более сильным, чем систолическое артериальное давления и ЛПВП в предсказании будущих событий [279]. На сегодняшний день более 20 исследований показали значение hs-СРБ в прогнозировании сердечно-сосудистых заболеваний в различных группах населения. Большинство исследований выявлено, что высокая концентрация СРБ (как правило, более 2 мг/л) является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. В исследовании YUPITER показано, что у пациентов, имевших низкий уровень ЛПНП и hs-СРБ, в дальнейшем был лучший прогноз, чем у больных с низким уровнем ЛПНП и высокой концентрацией hs-СРБ [137]. В исследовании YUPITER предположено, что измерение hs-СРБ может быть полезным для стратификации риска у мужчин старше 50 лет и женщин старше 60 лет с нормальным уровнем ЛПНП [175].

Крупнейший мета-анализ, основанный на одновременном изучении hs-СРБ и фибриногена в качестве предикторов ССЗ, опубликован в октябре 2012 года [216]. Этот мета-анализ основан на 52 проспективных исследованиях, включавших в себя почти 250 000 участников без предшествующей истории ССЗ и изучал прогностическую ценность добавление hs-СРБ или фибриногена к

обычным факторам риска [216]. Измерение hs-CРБ позволяло уточнить риск заболеваний. Аналогичные результаты были продемонстрированы для фибриногена. Однако ассоциации СРБ с риском инсульта получено не было. При анализе подгрупп показана лучшая производительность hs-CРБ у мужчин по сравнению с женщинами и у курильщиков по сравнению с некурящими. Эти результаты позволяют предположить, что на основе современных рекомендаций, определение hs-CРБ может предотвратить одно дополнительное сосудистое событие в течение 10 лет на 400-500 человек [216,252].

Таким образом, hs-CРБ в качестве предиктора будущих сердечно-сосудистых также хорош или даже лучше, чем несколько традиционных факторов риска. На основе таких доказательств в рекомендациях АСС/АНА в 2010 года стратегии определения hs-CРБ присвоен класс IIb, уровень доказательности B, как дополнительного маркера сердечно-сосудистого риска [80].

1.5.2. ЛПа. Существенным фактором атерогенеза является высокий уровень ЛПа. Известна причинно-следственная связь между циркулирующим липопротеином (а) (ЛПа) и ИБС [53,59]. Однако патофизиологические механизмы этой связи до конца неясны. Значительные экспериментальные данные свидетельствуют, что ЛП(а) имеет атерогенные и тромбогенные свойства [38,52]. Предполагается, что ЛП(а) может играть роль в атерогенезе и тромбофилии у больных ГБ и венозными тромбозами. Показано, наличие корреляции между концентрацией ЛПа и числом коронарных артерий с более чем 50% стенозом [34,109].

ЛПа открыт Kåre Berg в 1963г. Он включает в себя одну молекулу аполипопротеина (апо) В 100, ковалентно связанную в отношении 1:1 с апо(а) [69]. Этот уникальный гликопротеин, обладающий гидрофильными свойствами, вырабатывается в печени. Хотя ЛПа содержит ЛПНП-лиганд, печеночные ЛПНП рецепторы, вероятно, играют незначительную роль в его катаболизме. Концентрация ЛПа определяется в основном скоростью синтеза его в печени (~5,0 мг/кг в сутки). Катаболиз ЛПа заключается в диссоциации апо(а) и апо В-100, формировании различной молекулярной массы фрагментов и выведением их

через почки и/или утилизацией в селезенке [70]. Апо(а) является уникальным белком высоко гомологичным плазминогену, но лишенным его протеазной активности. Конкурентное ингибирование связывания плазминогена ЛПа, возможно, является эволюционно сформированной ролью в гемостазе и заживлении ран на участках артериального повреждения. Способствуя ослаблению фибринолиза, ЛПа увеличивает тем самым тромбообразование и доставку холестерина. ЛПа обладает прямым проатерогенным действием, так как, проникая в экстрацеллюлярный матрикс интимы, он участвует в активации моноцитов, опосредованной интегринами Mac-1, инициируя таким образом локальное воспаление сосудистой стенки [76]. Примечательно, что фосфолипиды, входящие в состав ЛПа, способны подвергаться окислению подобно фосфолипидам ЛПНП, что по результатам экспериментальных исследований значительно усиливает проатерогенные эффекты ЛПа [183]. Его атерогенный потенциал также может быть обусловлен связыванием окисленных фосфолипидов с apo B-100 [132].

Мета-анализ в рамках первичной профилактики подтвердил, что ЛПа является независимым фактором риска развития ИБС, смерти, нефатального ИМ и инсульта [79]. Наблюдается ассоциация между уровнем ЛПа и сердечно-сосудистыми заболеваниями для пациентов, курящих и имеющих высокий уровень липопротеинов высокой плотности [102]. Прогностическое значение ЛПа у пациентов, имеющих хороший контроль уровня холестерина, остается неясным. Согласно рекомендациям группы по изучению атеросклероза Европейского общества и национальной Липидной ассоциации можно рекомендовать оценку концентрации ЛПа у пациентов с промежуточным или высоким риском сосудистых событий [124]. Недавний анализ данных датского исследования, включавшего 8720 пациентов, привел к выводу, что уровень ЛПа более 80-й перцентилья (47 мг/дл) может быть наиболее полезным для реклассификации риска пациентов [149]. До настоящего времени представлено относительно мало исследований, в которых изучалось прогностическое значение ЛПа у пациентов с установленной ИБС [142,250,266]. Полученные результаты наблюдений

позволяют предположить, что взаимосвязь между ЛПА и коронарными событиями может быть ослаблена у пациентов с низким уровнем ЛПНП [25,61,118,141,144].

1.5.3. Широко обсуждается роль и место в атерогенезе **антимикробных пептидов (АМП)**, в том числе дефензинов. АМП эволюционно сформировались как молекулы, вовлеченные в механизмы защиты от широкого спектра микроорганизмов [180]. У млекопитающих эти пептиды защищают от бактерий, вирусов, грибов и некоторых паразитов. Недавно идентифицированы и другие их биологические эффекты, такие как нейтрализация эндотоксинов, хемотаксическое и иммуномодулирующее действие, индукция ангиогенеза и заживления ран. Таким образом, эти древние молекулы являются важнейшими компонентами врожденной иммунной системы и привлекательными кандидатами для новых терапевтических подходов. Они могут быть также вовлечены в патогенез атеросклероза. Эти пептиды найдены в атероматозных бляшках коронарных и церебральных артерий. До сих пор не ясно приносит ли пользу повышенная экспрессия этих молекул или причиняет вред сосудистой стенке [180].

Дефензины являются катионными пептидами с молекулярной массой от 3,5 до 4,5 кДа. Они содержат шесть высококонсервативных цистеиновых остатков, которые формируют дисульфидные мостики. Эти молекулы классифицируются на альфа-дефензины, бета-дефензины и е-дефензины [143]. Альфа-дефензины имеют от 29 до 35 аминокислотных последовательностей. В организме человека идентифицированы 6 подтипов альфа-дефензинов. Четыре из них содержатся в нейтрофильных гранулах и называются пептиды человеческих нейтрофилов (HNP)-1-4 [143]. Альфа-дефензины 5 и 6 подтипов (HD5 и HD6) обнаруживаются в клетках Паннета тонкого кишечника и в эпителиальных клетках урогенитального тракта женщин [278].

Дефензины принимают участие в обмене липопротеидов в эндотелии, у них обнаружено антифибринолитическое действие [143]. С другой стороны исследования на животных показали, что дефензины могут привести к дисфункции эндотелия коронарной артерии, уменьшая эндотелий-зависимую вазодилатацию [180]. Роль АМП в патогенезе атеросклероза также связывают с

увеличением экспрессии TLR в зонах атеросклеротических поражений. Активация этих рецепторов приводит к синтезу и высвобождению АМП и воспалительных цитокинов [180]. Таким образом, напрашивается вывод о том, что блокирование TLR или АМП может снизить прогрессирование атеросклероза [159]. Повышение плазменного уровня провоспалительных и проатерогенных дефензинов-альфа (HNP 1-3) было найдено у больных сахарным диабетом, страдающих ССЗ [129]. Плазменные α -дефензины могут служить в качестве клинических маркеров риска ССЗ, предиктором заболеваемости и смертности у больных СД 1 типа [113,114]. Однако необходимы дополнительные исследования для того, чтобы определить являются ли дефензины причиной или следствием ССЗ.

Дефензины и ЛПНП образуют стабильные комплексы в растворе и на поверхности клеток. Альфа-дефензины, секретируемые активированными нейтрофилами, обеспечивают связь между воспалением и атеросклерозом, изменяя катаболизм от ЛПНП-рецепторного пути на менее эффективный ЛПНП-рецептор независимый путь, опосредованный протеогликанами [113].

Дефензины альфа являются наиболее распространенными белками в нейтрофилах человека. Они находятся в гранулах нейтрофилов, где составляют 5% от общего клеточного белка [98]. Большие объемы альфа-дефензинов выделяются активированными нейтрофилами человека и, попадая в кровоток, вызывают резкое увеличение их концентрации в плазме при тяжелых бактериальных инфекциях [99]. Обнаружено, что эти пептиды влияют на три независимых хорошо известных фактора риска, участвующих в развитии атеросклероза. Во-первых, они стимулируют связывание ЛПНП и ЛПа [113] клетками и матриксом сосудистой стенки. Дефензины увеличивают тропность ЛПа к эндотелию примерно в четыре раза, а к ГМК примерно в шесть раз [113]. Эти исследования показывают, что дефензины, освобожденные из активированных или стареющих нейтрофилов, могут способствовать локализации и устойчивости ЛПа в человеческих сосудах и, таким образом, предрасполагают к развитию атеросклероза [113]. При этом они стимулируют связывание ЛПНП, но

препятствуют их деградации. Во-вторых, альфа-дефензины тормозят фибринолиз, опосредованный тканевым плазминогеном [100]. Этот процесс способствует развитию атеросклеротических поражений [100]. В третьих, альфа-дефензины стимулируют сокращение непораженных атеросклерозом кровеносных сосудов, что также способствует патогенезу ИБС [86].

Подтверждением связи между содержанием дефензинов в крови и развитием атеросклероза является то, что они найдены вокруг интимальных и медиальных ГМК в атеросклеротических поражениях сонных и коронарных артерий [91], что наблюдается даже на ранних этапах развития атеросклероза. При нормальных условиях лишь незначительное количество альфа-дефензинов обнаруживается в плазме крови. Значительное повышение этих пептидов выявляется в ходе воспалительных заболеваний. Маловероятно, что концентрация альфа-дефензинов в плазме точно отражает их совокупное поступление в кровотоки. Учитывая, что альфа-дефензины имеют короткий период полувыведения (9,7 мин) без экскреции с мочой или калом и протеазную устойчивость [113], было предположено, что эти катионные пептиды могут накапливаться в различных тканях. Обнаружено, что в дополнение к их присутствию в кровеносных сосудах [56], они накапливаются в коже человека. Кроме того, выявлено, что количество альфа-дефензинов, присутствующих в коже человека, коррелирует с тяжестью поражения коронарной артерии [101].

Недавно было показано, что альфа-дефензины действуют как агонисты тромбоцитов. Их высокий уровень связан с формированием агрегатов нейтрофилов и тромбоцитов, что влияет на эффективность терапии клопидогрелем [86].

1.5.4. Существенное значение в патогенезе атеросклероза и ассоциированных с ним клинических состояний имеют факторы свертывания крови. **VIIФ** играет центральную роль в инициации реакции коагуляции. Коагуляционный фактор VII, также называемый проконвертин, принадлежит к семейству сериновых протеаз [81]. Ген, контролирующий синтез VIIФ расположен на хромосоме 13 (13q34) [81]. Высокое содержание VIIФ фактора свертывания

обнаруживается у больных с гипертриглицеридемией, СД, а также у пожилых, пациентов с избытком массы тела и у женщин, использующих оральные контрацептивы и в постменопаузальный период [85]. Высокое содержание VIIф свертывания связывают с повышенным риском развития ОКС. Наоборот, низкие концентрации этого фактора уменьшают риск инфаркта миокарда. Увеличение активности VIIф рассматривается в качестве фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний и наблюдается при различных атеросклеротических заболеваниях [85]. В большом проспективном исследовании the Northwick Park Heart Study (NPHS) найдена независимая связь VIIф с риском развития ИБС [244].

В то же время не во всех исследованиях VIIф рассматривают как независимый фактор риска. Популяционные исследования, изучающие риск атеросклероза в популяции (ARIC), не показали значительной связи VIIф с осложнениями ИБС [81,134,153,211].

Вызывает интерес исследование G. Demetz (2010), который установил, что VIIф способствует высвобождению ИЛ-8 из ГМК и таким образом, может индуцировать привлечение лейкоцитов в сосудистую стенку и стимулировать воспалительную реакцию [68].

1.5.5. Еще более важное значение в развитии сердечно-сосудистой патологии, ассоциированной с атеросклерозом, имеет **ФВ**. Это мультимерный гликопротеин, который играет решающую роль в первичном гемостазе. В моменты, когда наступает повреждение эндотелия, а также в условиях высокой скорости сдвига, ФВ выступает в качестве связующего звена для тромбоцитов с эндотелием [235]. ФВ является белком-носителем для VIII фактора свертывания крови, предотвращая его протеолитическую деградацию. Ген ФВ расположен на 12 хромосоме и состоит из 178 тыс. пар нуклеотидов (КБ) и 52 экзонов. Концентрация ФВ в плазме колеблется в широких пределах и зависит от множества факторов, включая возраст, беременность и стресс [234].

Не менее 60% изменчивости уровня ФВ приходится на генетические вариации. ФВ синтезируется преимущественно в эндотелиальных клетках, а также в некоторой степени в альфа-гранулах мегакариоцитов и хранится в

частицах Вейбел-Паладе эндотелиальных клеток [234]. Мультимер ФВ, высвобождаемый из эндотелиальных клеток под действием агонистов, таких как тромбин, адреналин и коллаген, крупнее, чем тот, который обычно присутствует в плазме [128]. Циркулирующий ФВ почти полностью эндотелиального происхождения и в случае повреждения эндотелия, его плазменный уровень увеличивается. В связи с этим ФВ рассматривается в качестве маркера повреждения эндотелия или его дисфункции [235]. ФВ мультимер расщепляется по действием ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloprotease with ThromboSpondin 13), который преобразует сверхбольшой мультимер в более мелкие, менее прокоагулянтные формы [148].

Два опубликованных мета-анализа, включавших более 15 проспективных когортных исследований, состоящий из 899 и 6556 случаев соответственно, показали связь между концентрацией ФВ и ишемической болезнью сердца [260]. Однако, есть сомнения в том, является ли ФВ причиной или преимущественно маркером повреждения эндотелия [259]. В некоторых исследованиях корреляция между уровнем ФВ и ишемической болезнью сердца исчезала после устранения влияния С-реактивного белка (СРБ) или фактора VIII [235]. Есть мнение, что ассоциацию между ФВ и артериальным тромбозом может обусловить воспаление. Однако, скорее всего, с ИБС взаимосвязана не столько концентрация ФВ, сколько его функциональная активность [261].

Несколько исследований изучали связь между уровнем ФВ и сердечно-сосудистыми исходами, которая в большинстве исследований была определена, как сердечно-сосудистая смертность [263]. Whincup et al., в проведенном мета-анализе показали, что у больных с ранее существующими заболеваниями сосудов высокий уровень ФВ связан с рецидивирующей коронарной болезнью сердца и сердечно-сосудистой смертностью [257]. Корреляция между высоким уровнем ФВ и ишемическим инсультом была найдена в большинстве исследований, при этом авторы указывают, что уровень ФВ связан с ишемическим инсультом, главным образом при наличии атеросклероза крупных артерий. Уровень ФВ коррелирует с исходом ишемического инсульта [270], однако два недавних исследования не

выявили связи между уровнем ФВ и субклиническим инфарктом мозга по данным магнитно-резонансной томографии. Тот факт, что не все исследования показали связь между ФВ и ишемическим инсультом, может быть объяснен малым числом пациентов, включенных в эти работы [220].

Важная роль ФВ в развитии атеросклероза была установлена в исследованиях на животных с использованием свиней и мышей. Дефицитные по этому фактору животные имели менее выраженный атеросклероз по сравнению с диким типом [189]. В большинстве проспективных когортных исследований и мета-анализе, включающем более 6500 случаев показано, что высокие уровни ФВ ассоциируется с увеличением риска инфаркта миокарда [137]. Этот результат находится в соответствии с исследованиями на мышах, которые показывают, что у ADAMTS13 дефицитных мышей имеется более высокий риск инфаркта или ишемии головного мозга. [160]. Однако несколько исследований у лиц с тяжелой формой болезни фон Виллебранда, характеризующейся дефицитом ФВ в крови, не показали снижения выраженности атеросклероза. Выше изложенное свидетельствует о том, что роль ФВ в формировании атеросклероза в организме человека до конца не ясна [253,254].

1.5.6. Большой интерес представляет изучение **биомаркеров, связанных с процессами ремоделирования и повреждения миокарда**, в аспекте их связи с системным воспалением. Исследования натрийуретических пептидов (NP) в этой связи достаточно актуальны. Мета-анализ 40 проспективных исследований, включавших более 87000 участников, подтвердил независимые ассоциации между сывороточным уровнем мозгового NP и сердечно-сосудистыми событиями (более 10 000 событий) в различных сценариях [216]. Основным источником циркулирующих NP сердца является миокард [284]. Кроме того, было показано, что NP синтезируются и освобождаются в клубочковых мезангиальных клетках и эпителиальных клетках проксимальных канальцев [284]. NP, представляют собой семейство гормонов, которые оказывают ряд важных эффектов на сердечно-сосудистую систему. Это семейство включает в себя предсердный (ANP), В-тип (BNP) и С-тип (CNP) NP, которые реализуют свои физиологические эффекты

путем связывания с конкретными NP рецепторами, обозначаемыми NPR-A, NPR-B и NPR-C [194,236].

ANP выделяется главным образом миоцитами предсердий сердца, в то время как BNP секретируются миоцитами желудочков [188]. Растяжение волокон миокарда при перегрузке объемом или при ишемии миокарда являются наиболее существенным стимулом для их секреции. NP участвуют в поддержании гомеостаза в сердечно-сосудистой системе. Они обладают сосудорасширяющим и мочегонным действием, регулируют обмен натрия в сосудистой системе, почках и центральной нервной системе, а также участвуют в регуляции артериального давления и объемного гомеостаза [127].

BNP и ANP выделяются в виде больших молекул предшественников, соответственно NT-proBNP и proANP, которые затем расщепляются в аминотерминальном фрагменте и превращаются в активные гормоны, содержащие карбоксильную терминальную группу. Последняя имеет короткий период полураспада, тогда как N-терминальные фрагменты (NT-proBNP и NT-proANP) гораздо более стабильные формы и легко могут быть измерены [60]. Характеристики секреции для BNP и NT-proBNP схожи во многих клинических условиях [213]. Благодаря более высокой стабильности рекомендуется измерение содержания NT-proBNP [126]. То же самое справедливо для ANP и NT-proANP. Уровни NP увеличиваются в несколько раз у больных ИБС, вероятно, вследствие компенсационного механизма. Во время ишемии миокарда NP играют защитную роль, препятствуя эндотелиальной дисфункции, и опосредованному воспалением ущербу, способствуя расширению эпикардальных сосудов [126]. В высокой концентрации они могут также препятствовать пролиферации фибробластов, секреции коллагена и вызывать апоптоз миоцитов, таким образом, препятствуя процессу ремоделирования после эпизода ишемии миокарда [84].

NP оказывают защитное действие на миокард, предотвращая развитие гипертрофии сердца [212]. При возрастании преднагрузки на сердце стимулируется секреция NP, которые, в свою очередь, уменьшают давление наполнения сердца и улучшают сердечную деятельность. Выявлено, что эти

пептиды тормозят секрецию катехоламинов, эндотелина-1, ренина, ангиотензина II и альдостерона, которые способствуют ремоделированию сердца и развитию в миокарде соединительной ткани [135].

Есть свидетельства того, что системный воспалительный ответ повышает секрецию натрийуретических пептидов [72]. Было показано, сопоставимое увеличение уровня BNP и NT-proBNP у пациентов с тяжелым сепсисом, септическим шоком и острой сердечной недостаточностью [181]. В смешанной группе больных (кардиальными и некардиальными заболеваниями) с гемодинамической нестабильностью обнаружена сильная корреляция между уровнем натрийуретического пептида, СРБ в плазме крови и количеством лейкоцитов. Высказано предположение, что уровни BNP и NT-proBNP в плазме крови зависят от системного воспалительного ответа [236]. Доказательства в поддержку этой гипотезы были получены в экспериментальных исследованиях *in vitro*. Липополисахариды и провоспалительные цитокины, стимулировали экспрессию мРНК BNP в культивируемых миоцитах крыс [236].

1.5.7. Другими актуальными биомаркерами являются **белки, связывающие жирные кислоты (БСЖК)**. БСЖК - небольшие (14-15 кДа) цитоплазматические белки, которые обратимо связываются с гидрофобными лигандами, такими как насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с длинной цепью, эйкозаноиды и другие липиды [146]. Известно 9 тканеспецифических цитоплазматических БСЖК. БСЖК повышают растворимость и транспорт свободных жирных кислот (СЖК) к определенным ферментам и клеточным компартментам: к митохондриям и пероксисомам для окисления, к эндоплазматическому ретикулуму - для реэтерификации, к липидным каплям - для хранения и ядру - для регуляции экспрессии генов. [146].

Показано, что А-БСЖК адипоцитов/макрофагов тесно связаны с метаболическим синдромом, ожирением и развитием атеросклероза. Молекулярные пути, связывающие ожирение с метаболическим синдромом и атеросклероз интенсивно исследуется. Нарушение регуляции липидного обмена с повышением плазменной концентрации СЖК неизменно ассоциируется с

устойчивостью к инсулину и диабетом 2 типа [171]. Повышенные концентрации СЖК не только изменяют уровень глюкозы и метаболизм липидов, но также влияют на клеточные сигнальные каскады и экспрессию генов [171]. Эти гидрофобные соединения транспортируются в связанном с альбумином виде, их клеточное поглощение происходит путем пассивной диффузии или с помощью белок-опосредованного связывания и транслокации внутрь клетки БСЖК. А-БСЖК почти исключительно синтезируется адипоцитами и макрофагами, регулируется активатором пролиферации-пероксисом рецептора- γ (PPAR γ) и способствует развитию инсулинорезистентности и атеросклероза у мышей [146].

Сердечный (Heart- Н) БСЖК предложен как независимый прогностический маркер у больных с острым коронарным синдромом (ОКС) по крайней мере в 2 крупных исследованиях [171]. Недавно McCann et al. [51] сообщили, что Н-БСЖК и Nt pro-BNP являются независимыми прогностическими маркерами в дополнение к тропонину у больных с ОКС. Эти изоформы БСЖК могут играть важную роль в усвоении и оксигенации жирных кислот с длинной цепью в кардиомиоцитах. При повреждении клеточных мембран Н-БСЖК быстро попадает в межклеточное пространство и далее в системный кровоток, благодаря своим небольшим размерам и водорастворимости [51]. Показано, что риск смерти или рецидива ИМ возрастает с увеличением концентрации Н-БСЖК более 6,48 мкг/л. Повышенный уровень Н-БСЖК дает прямые доказательства ишемии миокарда даже, когда визуальный некроз миоцитов отсутствует. Meng et al. [171] показали, что у крыс концентрация Н-БСЖК повышалась более чем в 4 раза через 15 минут после индуцированной ишемии миокарда [171]. Это привело исследователей к выводу, что Н-БСЖК является одновременно чувствительным и ранним маркером ишемии миокарда.

1.5.8. Достаточно давно уделяется большое внимание **цитокинам**, которые могут, как способствовать, так и противодействовать воспалению, в том числе при атерогенезе. Цитокины делят на несколько групп: интерлейкины (межклеточные факторы), интерфероны (цитокины с противовирусной активностью), факторы некроза опухолей (цитокины с цитотоксической

активностью), колониестимулирующие факторы, гемопозитические цитокины [24,245,248].

ИЛ-6 имеет значение в развитии атеросклеротического процесса как провоспалительный фактор, продуцируемый моноцитами, макрофагами, лимфоцитами, фибробластами и клетками эндотелия. Биологические эффекты ИЛ-6 сходны с таковыми ИЛ-1 и ФНО-альфа. Прежде всего, это участие в реализации иммунной воспалительной реакции. По-видимому, ИЛ-6 более, чем два других провоспалительных цитокина, влияет на синтез белков острой фазы воспаления гепатоцитами. Его действие на местные проявления воспаления аналогично влияниям ИЛ-1. ИЛ-6 выделяется ГМК сосудов, способствуя воспалению, вызывает В-клеточную дифференцировку, активацию Т-клеток [39,217,218,248]. Кроме того, ИЛ-6 увеличивает PDGF-зависимую пролиферацию гладкомышечных клеток [115,116]. Известно, что ИЛ-6 способствует как обострению хронических, так и переходу острых воспалительных процессов в хронические. Выделяясь несколько позже, чем ИЛ-1 и ФНО-альфа, ИЛ-6 подавляет их образование (они, наоборот, стимулируют его выделение) и поэтому относится к цитокинам, завершающим развитие воспалительной реакции [248].

ФНО-альфа преимущественно продуцируется моноцитами/макрофагами, клетками эндотелия и тучными клетками. По спектру клеток-мишеней и биологических эффектов ФНО-альфа напоминает ИЛ-1 и ИЛ-6. Цитотоксическое действие ФНО-альфа имеет комплексную природу. Обладая способностью индуцировать апоптоз, ФНО-альфа вызывает генерализацию активных форм кислорода, супероксид-радикалов, а также оксида азота в клеточной мембране. ФНО-альфа влияет на эндотелий, усиливая экспрессию на нем молекул адгезии, активизирует макрофаги, нейтрофилы, увеличивает секрецию простагландинов, оказывает хемотаксическое действие на различные клетки и обуславливает синтез белков острой фазы воспаления [46]. Было показано, что постишемическая реперфузия миокарда сопровождается выделением цитокинов (ФНО-альфа, ИЛ-1, ИЛ-6) [111].

Интерлейкин-8 (ИЛ-8) является не только хемоаттрактантом нейтрофилов и лимфоцитов, но и моноцитарным агонистом и может быть обнаружен в богатых макрофагами атеросклеротических бляшках [248]. Эти данные указывают на роль ИЛ-8 в миграции моноцитов в интиму при атерогенезе.

Резюме

Таким образом, представленные в обзоре данные свидетельствуют о продолжающейся пандемии атеросклероза, поразившей человеческие популяции в развитых странах мира. Широко распространены не только цереброваскулярная патология и ИБС, но и атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей.

Анализ гипотез патогенеза атеросклероза показал его мультифакторный характер. При этом велика роль воспаления, адаптивного и врожденного иммунитета. В процессе атерогенеза участвует кооперация различных клеток: эндотелиоцитов, клеток иммунной системы, клеток крови и других. В последние годы многие авторы проявляют большой интерес к исследованию роли нейтрофилов в этом процессе.

На основе современных данных о патогенезе атеросклероза ведется поиск «новых» биомаркеров этого патологического процесса. Большое внимание уделяется показателям врожденного и адаптивного иммунитета, воспаления, свертывания крови, гемодинамического стресса, а также новым липидным факторам.

Представляется целесообразным дальнейшее выявление и диагностическая оценка маркеров активности атерогенеза, разделение их на ранние и поздние факторы. Актуальна разработка комплекса биохимических и лейкоцитарных маркеров для верификации активности и распространенности атеросклеротического процесса.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Планирование исследования.

Для решения поставленной цели и задач исследования было запланировано сравнительное исследование. Формирование групп наблюдения проводилось методом последовательной рандомизации [5]. Предполагаемая мощность исследования по специальным методам обследования установлена в диапазоне от 70 до 90 процентов [26]. Исходя из этого предварительно определен размер выборки для достижения заложенной мощности исследования по формуле 1 (*метод применяется при неизвестном виде закона распределения переменных*) с использованием программного пакета Статистика 8.0.

Формула 1: $N(x) = \ln(1 - \alpha) / \ln P(x)$,

где $N(x)$ - минимальное число объектов, α - значение доверительной вероятности, $P(x)$ - заданная мощность исследования.

Расчет произведен по показателю ЛВСЛ, для которого в предыдущих исследованиях определена дисперсия (среднеквадратичное исследование (SD) - 0,03) [5]. Оказалось, что для мощности исследования 70%, минимальное количество пациентов должно составить 19, а для достижения мощности 90% - 39 человек.

2.2. 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 составили 33 практически здоровых человека.

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

Группы наблюдения и сравнения были сопоставимы по возрастному и половому составу (подробную характеристику групп см. ниже).

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.

Критерии включения в группу больных ГБ были следующие:

- наличие артериальной гипертензии;
- отсутствие клинических проявлений атеросклеротического поражения артерий;
- отсутствие ультразвуковых признаков поражения брахецефальных артерий;
- отрицательный нагрузочный тест на выявление транзиторной ишемии миокарда.

Критерии включения в группу больных ИБС:

- ангиографическое подтверждение поражения коронарного русла;
- анамнестические признаки - наличие перенесенного ИМ или коронарного шунтирования (КШ) более 12 месяцев назад;

- достоверные признаки транзиторной ишемии миокарда по результатам нагрузочных тестов;

- отсутствие клинических и/или инструментальных (ультразвуковых) признаков поражения артерий других бассейнов.

Критерии включения в подгруппу больных стенокардией напряжения, помимо общих для группы больных ИБС, были следующие:

- отсутствие изменения функционального класса стенокардии напряжения в течение последних 3 месяцев;

- отсутствие эпизодов стенокардии покоя в течение последних 3 месяцев;

- достоверные признаки транзиторной ишемии миокарда по данным суточного мониторирования электрокардиограммы или тредмил-теста (или велоэргометрии) со стабильным ишемическим порогом.

Критерии включения в подгруппу больных нестабильной стенокардией, помимо общих для группы больных ИБС, были следующие:

- изменение функционального класса стенокардии в течение последнего месяца;

- эпизоды стенокардии покоя;

- отсутствие признаков вторичного характера нестабильности течения ИБС: анемия любого генеза, дестабилизация течения ГБ и/или гипертонические кризы, острые пароксизмальные нарушения ритма сердца, изменения функции щитовидной железы, неадекватное лечение.

Критерии включения в группу больных ОААНК были следующие:

- клинические признаки поражения артерий нижних конечностей («перемежающая» хромота, физические признаки поражения артерий нижних конечностей);

- ультразвуковые признаки поражения артерий нижних конечностей (увеличение толщины интимы-медии (ТИМ), визуализация атеросклеротических бляшек, ЛПИ - менее 0,9);

- ангиографические признаки поражения артерий нижних конечностей;

-анамнестические признаки - наличие оперативного лечения, связанного с ОААНК, более 12 месяцев назад.

- отсутствие клинических признаков поражения артерий других бассейнов;

-отрицательный тест предсердной стимуляции на выявление транзиторной ишемии.

Критериями включения в группу больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ, были следующие:

- клинические признаки поражения артерий более 2 сосудистых бассейнов;

-инструментальные признаки поражения артерий более 2 сосудистых бассейнов.

Критерии включения в группу сравнения:

-отсутствие клинических проявлений каких-либо заболеваний, в том числе ассоциированных с атеросклерозом;

-дистанция, пройденная в тесте 6 минутной ходьбы более 500 м;

-отсутствие ультразвуковых признаков поражения брахиоцефальных артерий;

- отрицательные тесты на транзиторную ишемию миокарда;

Пациентам групп наблюдения и сравнения проводилось специальное обследование, включающее исследование лейкоцитарных культур (см. ниже).

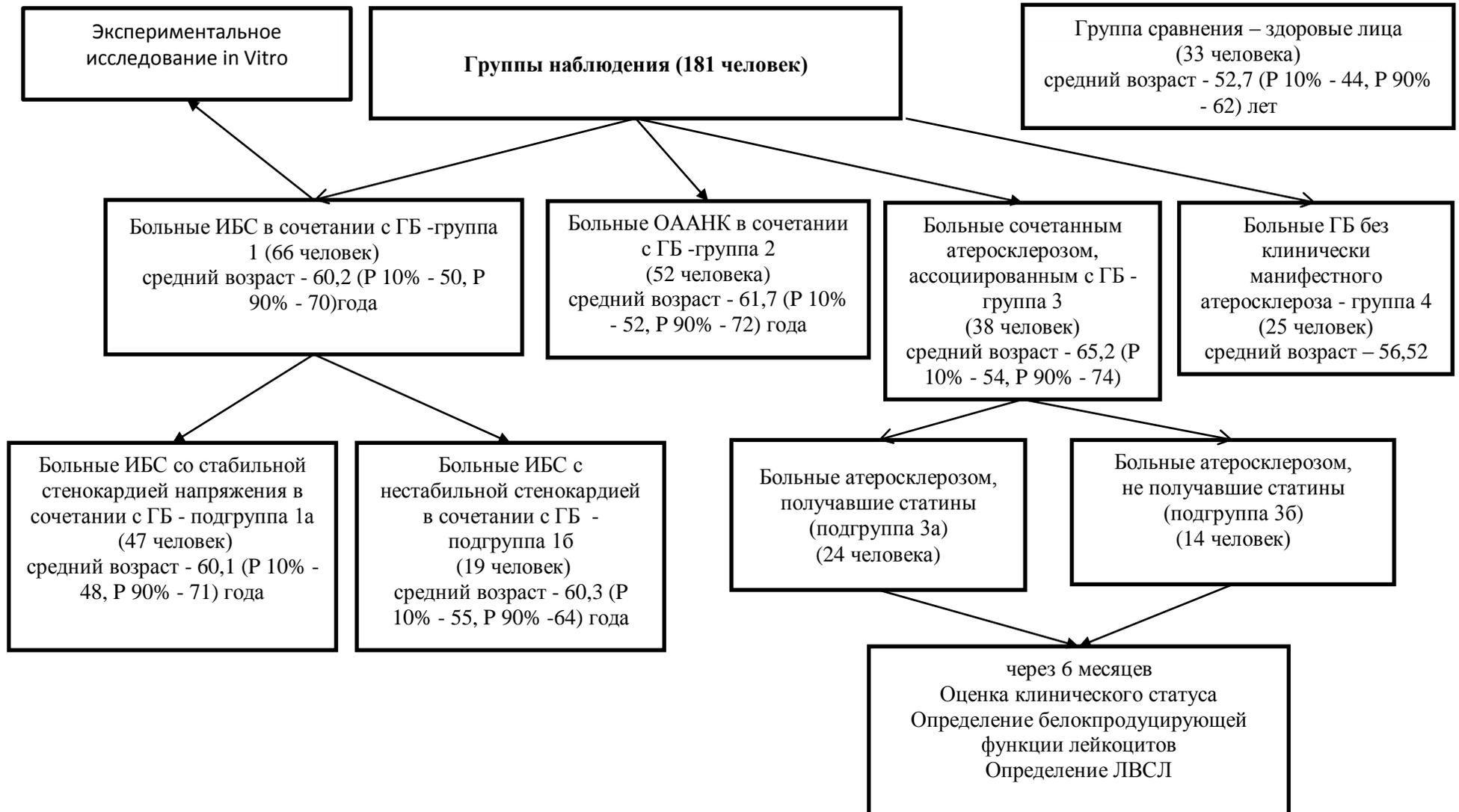


Схема 1. Дизайн исследования

2.3. Клиническая характеристика групп и подгрупп обследования и сравнения.

2.3.1. Группа больных ИБС в сочетании с ГБ (1 группа наблюдения). В эту группу было включено 66 пациентов 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 (72%), лица с отягощенным семейным анамнезом (62%).

Преобладающей сопутствующей патологией у пациентов этой группы была ГБ (в 100% случаев). У 2% пациентов выявлялась варикозная болезнь вен нижних конечностей, хронический пиелонефрит и хронический панкреатит, у 6% - мочекаменная болезнь (МКБ), хронический гастродуоденит (ХГД) вне обострения, хронический холецистит (ХХ) вне обострения и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), у 7% язвенная болезнь (ЯБ) желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК) в анамнезе.

Клиническая характеристика группы, основанная на сборе анамнеза и физикальном обследовании, представлена в таблице 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных ИБС стабильного течения в сочетании с ГБ

	Mean	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Стаж ИБС, лет	3,95	1,00	10,00	4,16
Стаж АГ, лет	4,30	1,00	8,50	2,72
ИМТ, кг/м ²	24,88	23,00	27,00	1,45

Пояснения к таблице: ИМТ – индекс массы тела.

В преобладающем большинстве случаев у пациентов этой группы выявлялись II и III ФК ХСН (диаграмма 1) [10], 2 стадия хронической болезни почек (ХБП), определенной на основании расчета скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле СКД EPI (диаграмма 2)[12].

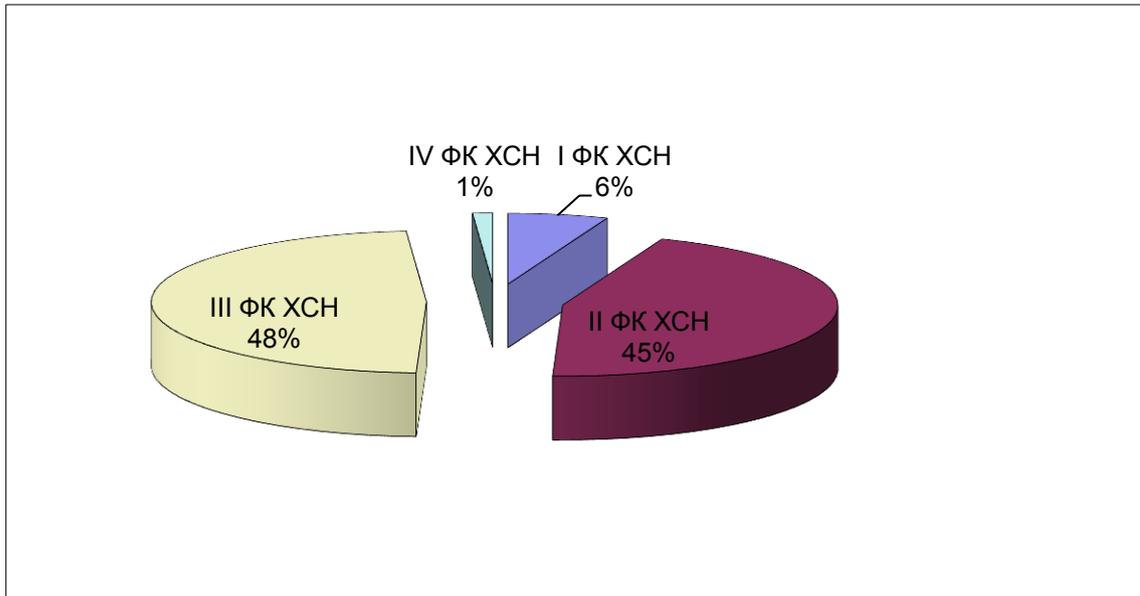


Диаграмма 1. Доля пациентов с разными ФК ХСН в группе больных ИБС в сочетании с ГБ

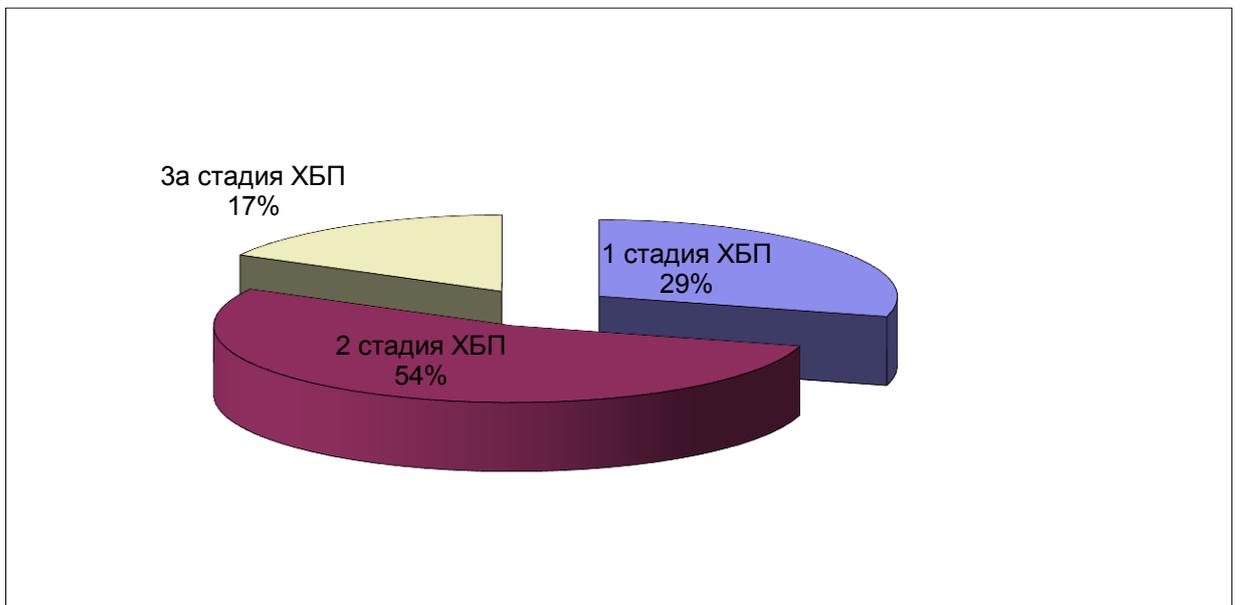


Диаграмма 2. Структура тяжести ХБП у больных ИБС в сочетании с ГБ

У 65% пациентов этой группы в анамнезе был ИМ, у 7% - пароксизмы фибрилляции предсердий (ФП). Среди больных ИБС 52% перенесли коронарное шунтирование (КШ).

Пациенты 1 группы обследования (больные ИБС) получали следующие группы препаратов:

1) ингибиторы-АПФ (эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, квадроприл, периндоприл, рамиприл) 82% пациентов;

- 2) β -блокаторы (конкор, беталок-зок, метопролол, карведилол) 91% пациентов,
- 3) сартаны (лозартан, валсартан, кандесартан, телмисартан) 22% пациентов;
- 4) кораксан 7% пациентов;
- 5) диуретики (диувер, верошпирон, индапамид) 72% пациентов,
- 6) аспирин 91% пациентов,
- 7) клопидогрель 29% пациентов;
- 8) нитраты (моно и динитраты) 11% больных,
- 9) статины (симвастатин, аторвастатин, розувастатин) 88%;
- 10) фенофибрат – 3% пациентов;
- 11) омакор - 6% пациентов.
- 12) антагонисты кальция (амлодипин) – 34% пациентов;
- 13) варфарин - 7% больных.

2.3.1.1. Группа больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ.

В эту подгруппу включено 47 человек. Клиническая характеристика группы, основанная на сборе анамнеза и физикальном обследовании, представлена в таблице 2.

Таблица 2

Клиническая характеристика больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ

	Mean	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Возраст, годы	60,14	48,00	71,00	9,49
Стаж ИБС, лет	3,95	1,00	10,00	4,16
Стаж АГ, лет	4,30	1,00	8,50	2,72
ИМТ, кг/м ²	24,88	23,00	27,00	1,45

Пояснения к таблице: ФК - функциональный класс стенокардии напряжения [23].

Среди пациентов этой группы также преобладали мужчины (78%), курящие (74%), 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.

В преобладающем большинстве случаев у пациентов этой группы выявлялись II и III ФК ХСН (диаграмма 3) [11] и 2 стадия ХБП, определенной на основании расчета СКФ по формуле СКД EPI (диаграмма 4) [13].

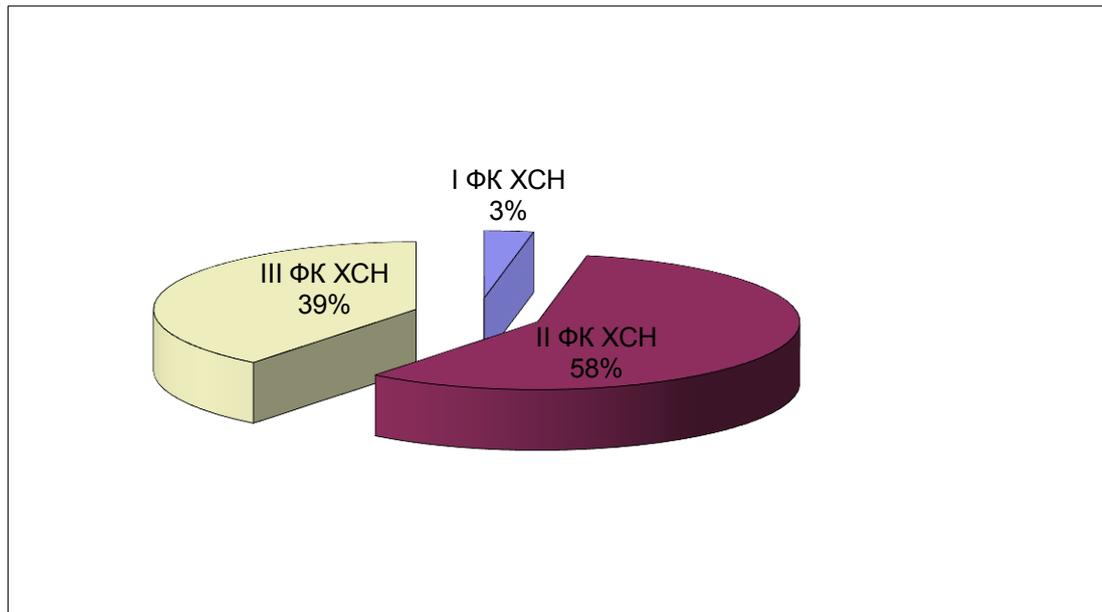


Диаграмма 3. Структура тяжести ХСН у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ

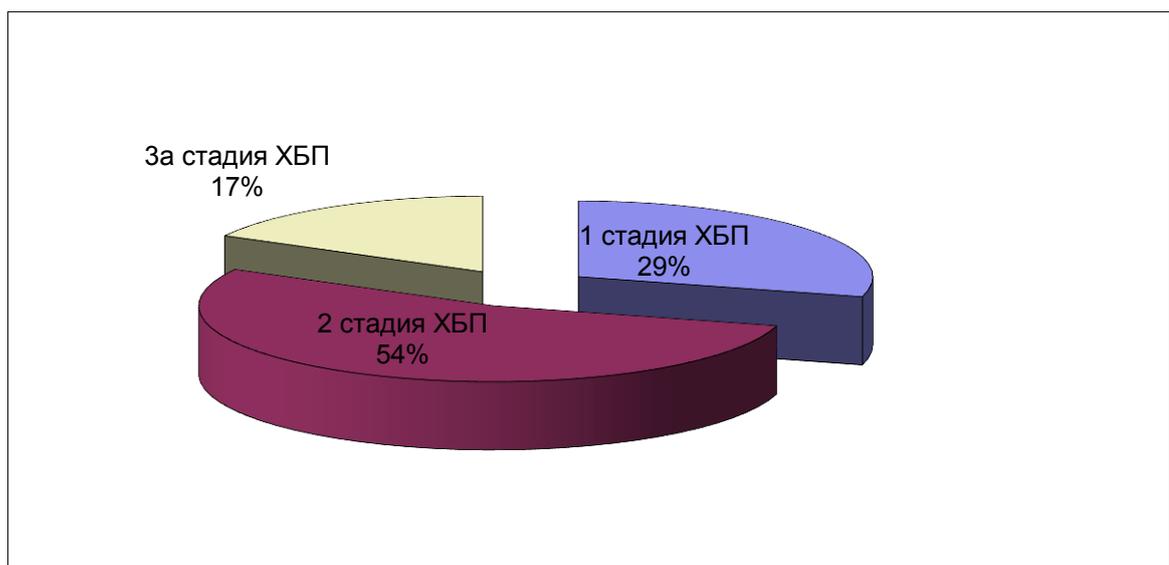


Диаграмма 4. Структура тяжести ХБП у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ

Структура сопутствующей заболеваемости у больных ИБС стабильного течения была следующей: в 100% случаев выявлялась ГБ, в 7% - МКБ, ХХ, ЯБ вне обострения, ХГД вне обострения и ХОБЛ; в 3% - варикозная болезнь вен нижних конечностей, хронический пиелонефрит вне обострения, хронический панкреатит вне обострения. У 65% пациентов этой группы в анамнезе был ИМ, у 7% имелись пароксизмы ФП.

Пациенты 1а подгруппы обследования (больные ИБС стабильного течения) получали следующие группы препаратов:

- 1) ингибиторы-АПФ (эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, квадроприл, периндоприл, рамиприл) - 79% пациентов;
- 2) β -блокаторы (конкор, беталок-зок, метопролол, карведилол) - 87% пациентов,
- 3) сартаны (лозартан, валсартан, кандисартан, телмисартан) - 19% пациентов;
- 4) кораксан - 15% пациентов;
- 5) диуретики (диувер, верошпирон, индапамид) - 65% пациентов,
- 6) аспирин - 97% пациентов,
- 7) клопидогрель - 3% пациентов;
- 8) нитраты (моно и динитраты) - 17% больных,
- 9) статины (симвастатин, аторвастатин, розувастатин) - 85%;
- 10) фенофибрат – 2% пациентов;
- 11) омакор - 3% пациентов.
- 12) антагонисты кальция (амлодипин) – 29% пациентов;
- 13) варфарин - 7% больных.

Из группы больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ 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 5 пациентов был в анамнезе перенесенный инфаркт миокарда (не ранее одного года до включения в группу), все пациенты имели положительную по выявлению ишемии нагрузочную пробу. Проведенные нагрузочные тесты указывали на переносимость нагрузки, соответствующей III ФК стенокардии. Все пациенты имели ГБ.

2.3.1.2. Группа больных ИБС нестабильного течения в сочетании с ГБ (16 подгруппа).

Эту подгруппу составили 19 больных ИБС с первичной нестабильной стенокардией. Средний возраст этих пациентов составил $60,3 \pm 3,5$ (SD) лет (percentile 10% - 55, percentile 90% - 64). Среди обследованных преобладали мужчины - 58%, курящие табак - 71%, с отягощенным семейным анамнезом - 74%.

Структура форм нестабильной стенокардии была следующей: у 67% отмечалась клиника прогрессирующей стенокардии, 19% - подострой стенокардии покоя и 4% - острой стенокардии покоя.

В большинстве случаев у пациентов этой группы выявлялись II и III ФК ХСН (диаграмма 5) [11] и 2 стадия ХБП, определенной на основании расчета СКФ по формуле СКД EPI (диаграмма 6) [13].

В структуре сопутствующей патологии преобладала ГБ (100%), в 25% случаев выявлялась ХОБЛ, в 8% - язвенная болезнь, в 2% - МКБ и ХХ вне обострения.

Пациенты этой подгруппы получали следующие препараты:

1) ингибиторы-АПФ (эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, квадроприл, периндоприл, рамиприл) - 77% пациентов;

2) β -блокаторы (конкор, беталок-зок, метопролол, карведилол) - 98% пациентов,

3) сартаны (лозартан, валсартан, кандисартан, телмисартан) - 23% пациентов;

4) диуретики (диувер, верошпирон, индапамид) - 61% пациентов,

5) аспирин - 100% пациентов,

6) клопидогрель - 88% пациентов;

7) нитраты (моно и динитраты) - 28% больных,

8) статины (симвастатин, аторвастатин, розувастатин) - 98%;

9) омакор - 4% пациентов;

10) амлодипин - 23% пациентов;

11) антикоагулянты (гепарин, клексан) - 88% больных.

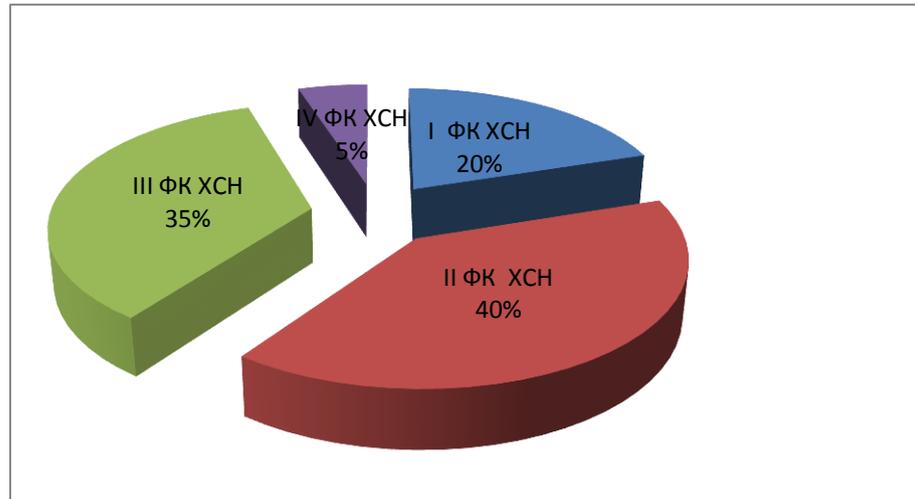


Диаграмма 5. Структура тяжести ХСН у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ

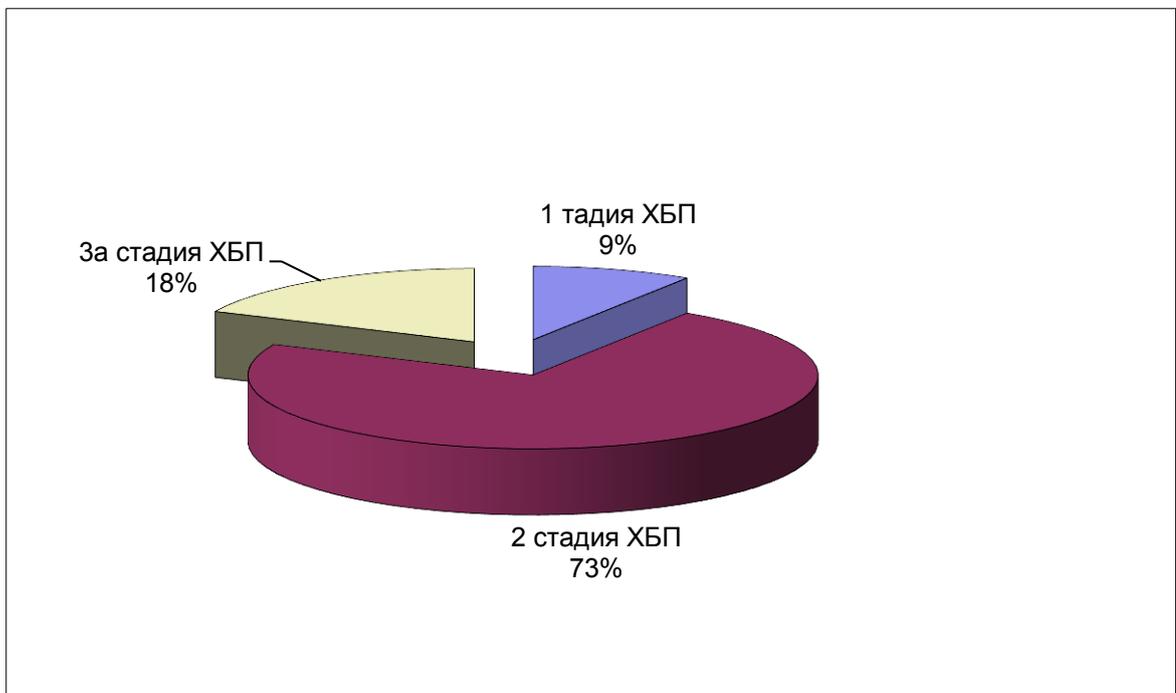


Диаграмма 6. Структура тяжести ХБП у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ

2.3.2. Группа больных ОААНК в сочетании с ГБ (2 группа обследования).

Эту группу составили 52 пациента.

Клиническая характеристика группы, основанная на данных анамнеза и физикального обследования представлена в таблице 3.

Клиническая характеристика больных облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей в сочетании с ГБ

	Mean	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Возраст, лет	61,76	52,00	72,00	7,74
ИМТ, кг/м ²	26,34	23,00	29,00	7,00
Длительность боли в ногах, лет	3,73	1,00	10,00	3,13
ДБХ, м	86,21	0,00	200,00	130,94

Пояснения к таблице: ДБХ –дальность безболевого ходьбы

В группе больных ОААНК преобладали мужчины (67%), курящие табак (72%), лица с отягощенным семейным анамнезом (57%).

Среди пациентов ОААНК чаще выявлялась 2б стадия хронической артериальной недостаточности (ХАН) (67%, диаграмма 7) и 2 стадия ХБП, определенной на основании расчета СКФ по формуле СКД ЕРІ (диаграмма 8) [13].

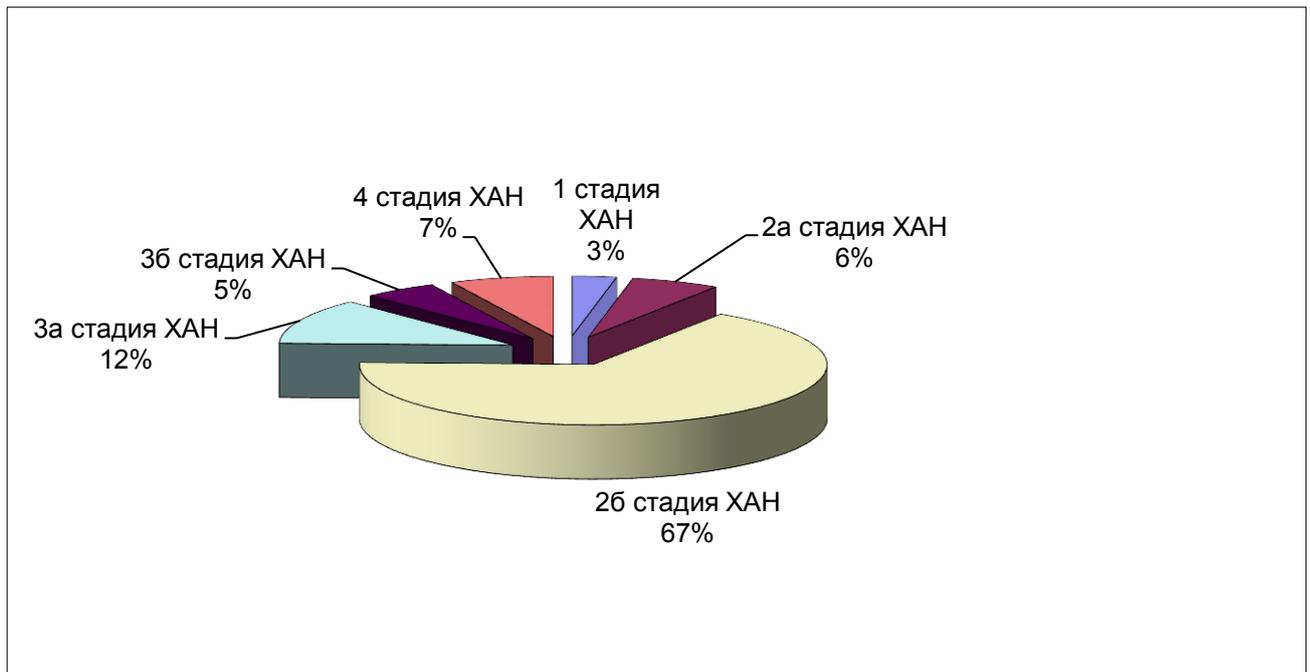


Диаграмма 7. Структура тяжести ХАН у больных ОААНК в сочетании с ГБ

Структура сопутствующей патологии была следующей: в 100% случаев выявлялась ГБ, в 23% -ХОБЛ, в 12% - остеоартроз, в 6% - ЯБ вне обострения, в 7% - варикозная болезнь вен нижних конечностей, в 3% - хронический простатит.

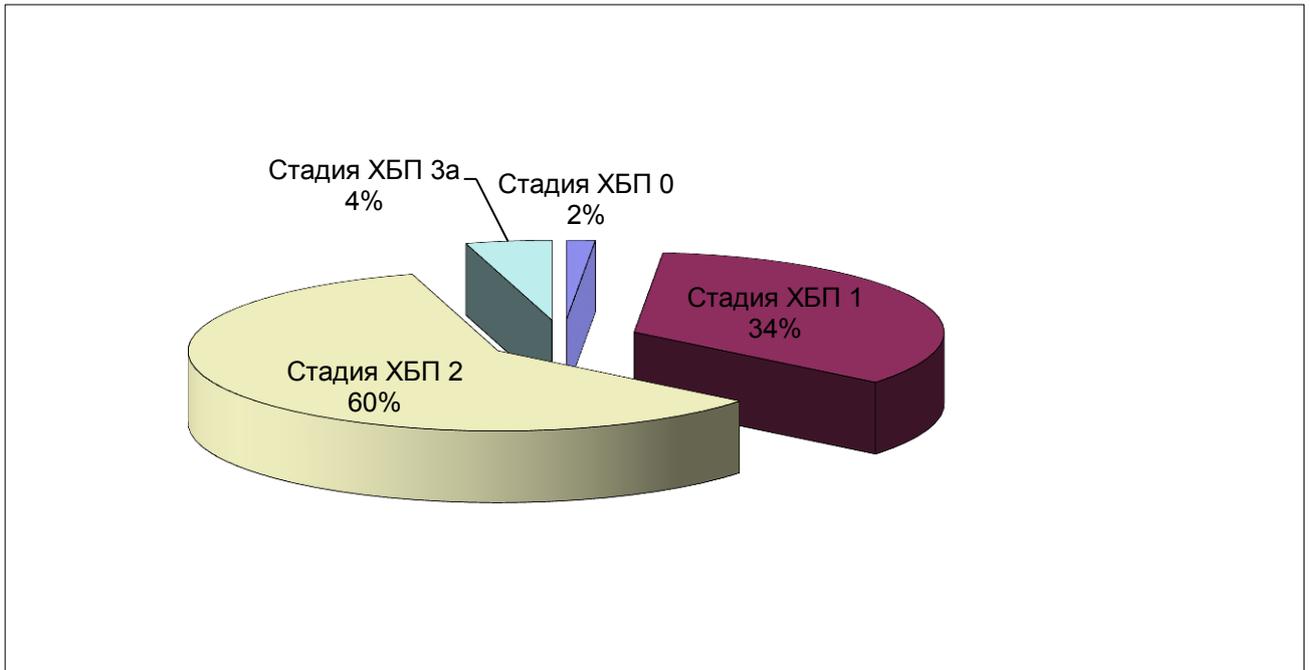


Диаграмма 8. Структура тяжести ХБП у больных ОААНК в сочетании с ГБ

Пациенты этой группы получали следующие препараты:

- 1) ингибиторы АПФ (эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, квадроприл, периндоприл, рамиприл) - 33% пациентов;
- 2) β -блокаторы (конкор, беталок-зок, метопролол, карведилол) - 22% пациентов,
- 3) сартаны (лозартан, валсартан) - 7% пациентов;
- 4) диуретики (диувер, верошпирон, индапамид) - 22% пациентов,
- 5) аспирин - 90% пациентов,
- 6) клопидогрель - 12% пациентов;
- 7) трентал - 23% больных;
- 8) статины (симвастатин, аторвастатин, розувастатин) - 15%;
- 9) амлодипин - 8% пациентов;

У 82% пациентов с ОААНК ранее проводилось оперативное лечение. Преобладающие виды оперативного вмешательства - бедренно-подколенное шунтирование (35%) и эндартериектомия (37%) (диаграмма 9).

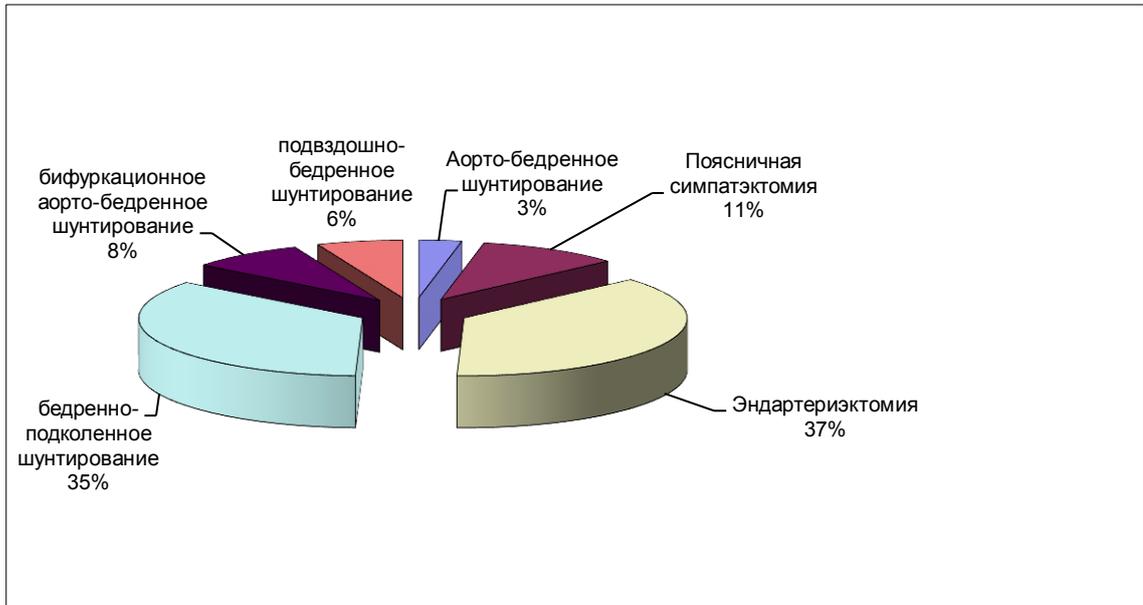


Диаграмма 9. Структура предпринятых оперативных вмешательств у больных ОААНК в сочетании с ГБ

2.3.3. Группа больных атеросклерозом сочетанного течения, ассоциированного с ГБ.

В данную группу включено 38 пациентов.

Клиническая характеристика группы, основанная на данных анамнеза и физикального обследования представлена в таблице 4.

Таблица 4

Клиническая характеристика больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ

	Mean	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Возраст, лет	65,26	54,00	74,00	7,48
ИМТ, кг/м²	25,56	23,00	28,00	2,04

В группе больных сочетанным течением атеросклероза преобладали мужчины (87%), курящие табак (71%), с отягощенным семейным анамнезом по атеросклерозу (76%).

Среди больных этой группы преобладали пациенты с поражением двух сосудистых бассейнов (93%) (диаграмма 10).

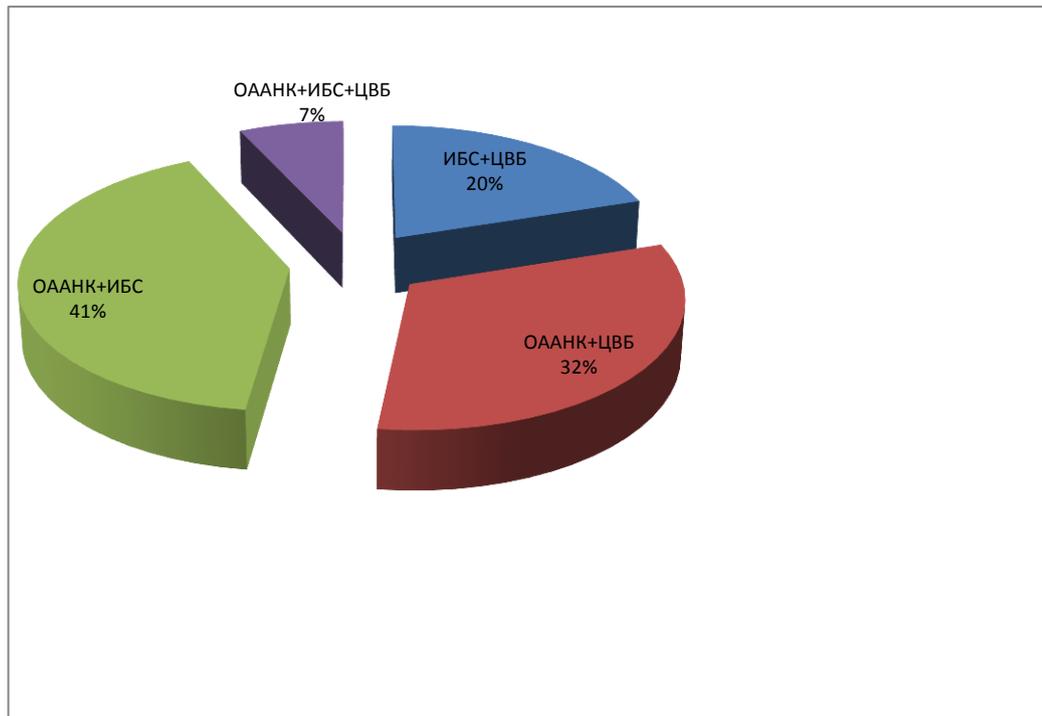


Диаграмма 10. Структура поражения сосудистых бассейнов в группе больных атеросклерозом сочетанного течения, ассоциированным с ГБ

У пациентов, имеющих поражение артерий нижних конечностей преобладали лица с 2б стадией ХАН (67%, диаграмма 11). 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.

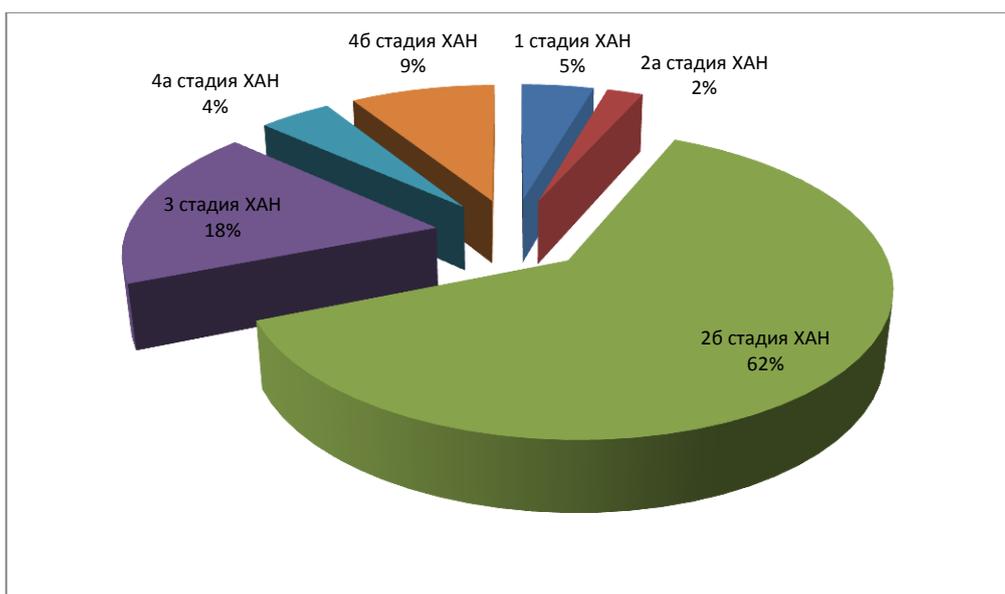


Диаграмма 11. Структура тяжести ХАН у больных сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБ

Структура ХБП, определенной на основании расчета СКФ по формуле СКД ЕРІ [13], представлена на диаграмме 12.

Структура сопутствующей патологии была следующей: ГБ - 100%, ХОБЛ и остеоартроз – 11%, ЯБ вне обострения и варикозная болезнь вен нижних конечностей – 4%. У 67% пациентов в анамнезе был ИМ и у 22% инсульт.

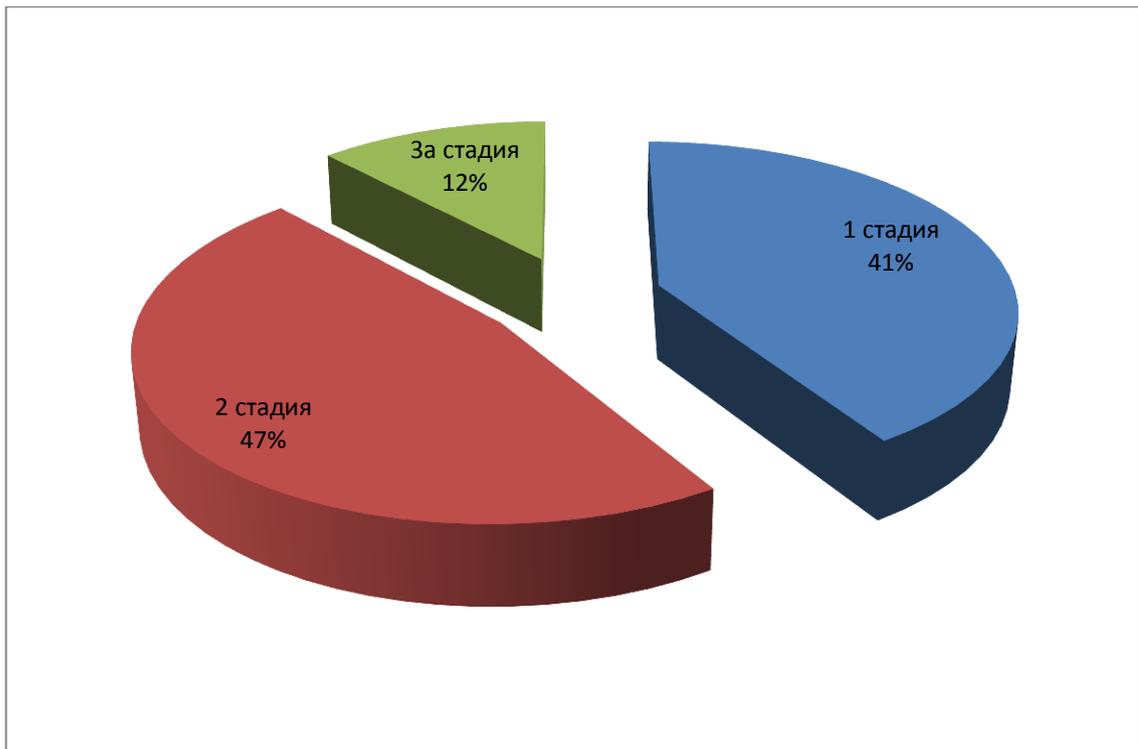


Диаграмма 12. Структура тяжести ХБП у больных атеросклерозом сочетанного течения, ассоциированным с ГБ

Пациенты этой группы получали следующие препараты:

- 1) ингибиторы АПФ (эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, квадроприл, периндоприл, рамиприл) - 83% пациентов;
- 2) β -блокаторы (конкор, беталок-зок, метопролол, карведилол) - 62% пациентов,
- 3) сартаны (лозартан, валсартан) - 17% пациентов;
- 4) диуретики (диувер, верошпирон, индапамид) - 52% пациентов,
- 5) аспирин - 93% пациентов,
- 6) клопидогрель - 17% пациентов;

- 7) трентал - 27% больных;
- 8) статины (симвастатин, аторвастатин, розувастатин) - 5%;
- 9) амлодипин - 18% пациентов;

У 67% пациентов этой группы в анамнезе (более года назад) проводилось оперативное лечение по поводу ОААНК. Преобладающими оперативными вмешательствами на артериях нижних конечностей были бедренно-подколенное шунтирование (33%) и эндартерийэктомия (48%). Среди больных этой группы, имеющих ИБС в 30% случаев в анамнезе более года назад было предпринято КШ.

2.3.4. Группа больных ГБ без клинических и ультразвуковых признаков атеросклероза (4 группа обследования).

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

Среди больных ГБ равномерно распределены доли лиц, не имеющих ХСН, а также пациентов с I и II ФК ХСН (диаграмма 13). Преобладающая доля пациентов с ГБ не имели признаков ХБП (диаграмма 14).

Структура сопутствующей патологии в данной группе была следующей: в 28% выявлялось ожирение, в 16%- ХХ вне обострения, в 8% - ХГД вне обострения, язвенная болезнь вне обострения и МКБ, в 8% отмечались нарушения ритма сердца.

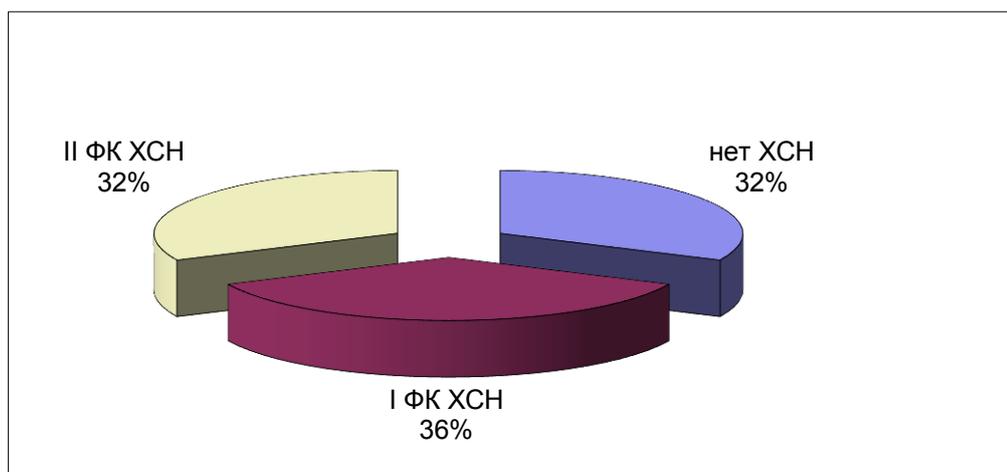


Диаграмма 13. Структура тяжести ХСН у больных ГБ

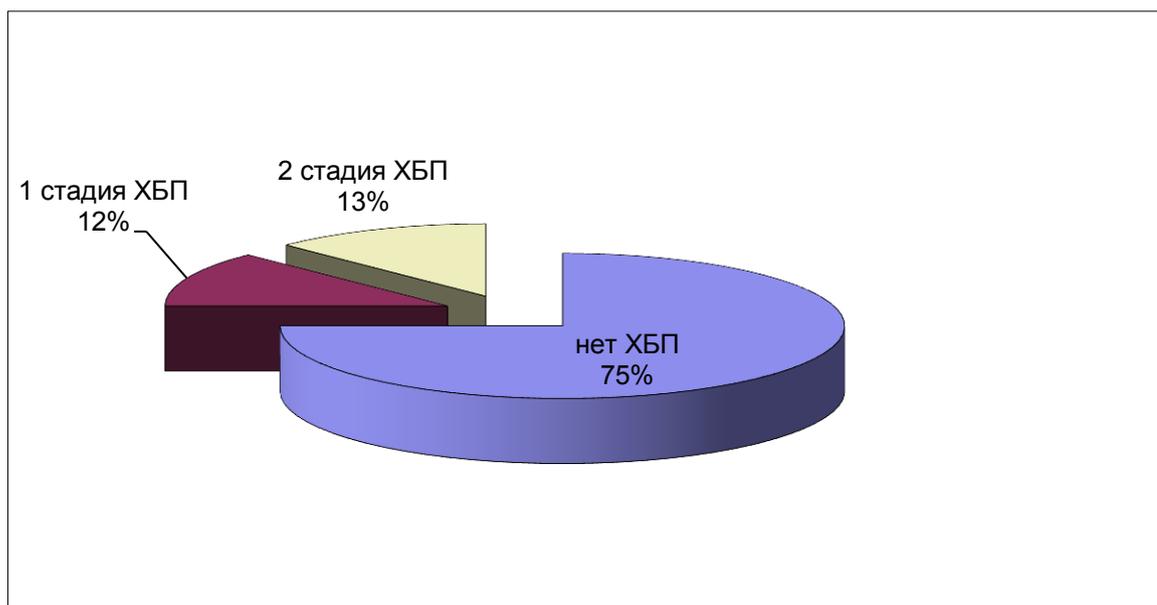


Диаграмма 14. Структура тяжести ХБП у больных ГБ

Пациенты этой группы получали следующие препараты:

1) ингибиторы АПФ (эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, квадроприл, периндоприл, рамиприл) - 74% пациентов;

2) β -блокаторы (конкор, беталок-зок, метопролол, карведилол) - 22% пациентов,

3) сартаны (лозартан, валсартан) - 26% пациентов;

4) диуретики (гипотиазид, индапамид) - 33% пациентов,

5) статины (симвастатин, аторвастатин, розувастатин) - 12%;

6) амлодипин - 19% пациентов.

2.3.4. Группа сравнения.

Данная группа включает 33 здоровых человека среднего возраста $52,7 \pm 8,01$ (SD) лет (percentiie 10% - 41, percentile 90% - 62). Среди них было 66% мужчин и 34% женщин, преобладали некурящие лица (62%), у большинства обследованных не выявлялосьотягощенного семейного анамнеза по атеросклерозу (72%).

2.4. Методы обследования.

2.4.1.Общеклиническое обследование, тесты.

Общеклиническое обследование включало сбор анамнеза, физическое обследование пациентов.

Для верификации тяжести ХСН применялся тест шестиминутной ходьбы в модифицированном варианте [11].

Для увеличения точности исследования разработан модифицированный тест шестиминутной ходьбы с on-line мониторингом частоты сердечных сокращений (ЧСС) [8]. Тестирование проводили утром перед завтраком или через 2 часа после завтрака. Использовали дистанционный монитор ЧСС с функцией GPS-навигатора, например, Forerunner 405. Электроды прибора фиксировали на передней поверхности грудной клетки на уровне нижней трети грудины, примерно в V межреберье. Вводили в программу прибора индивидуальные значения (пол, дату рождения, массу тела) больного и программировали показания дисплея и сигналы (ЧСС, процент от максимальной ЧСС, пройденное расстояние, время движения). Включали прибор, регистрировали ЧСС в покое при положении больного стоя. Затем предлагали больному пройти максимальное расстояние в течение 6 минут под контролем показаний монитора ЧСС. Если во время ходьбы ЧСС не достигала 50% уровня от максимального индивидуального значения в течение первых 2-х минут тестирования, предлагали увеличить темп ходьбы. Если достигнутая величина ЧСС превышала 55% от максимального значения – снизить темп ходьбы. По истечении 6 минут врач фиксировал пройденную пациентом дистанцию.

Диагностирование функционального класса хронической сердечной недостаточности у больного ИБС осуществляли по установленным правилам [11]. Дистанция менее 550, но более 425 метров соответствует I функциональному классу, 300-425 метров – II, 150-300 метров – III и менее 150 метров соответствует IV ФК ХСН.

Данный способ в отличие от традиционного с произвольным выбором темпа ходьбы позволяет минимизировать субъективный фактор в ходе выполнения теста и благодаря этому более точно оценить ФК пациента.

Тяжесть хронической артериальной недостаточности у больных ОААНК оценивалась по шкале Фонтейна (таблица 5), которая предполагает оценку дистанции безболевой ходьбы (ДБХ), физическое обследование нижних конечностей и оценку ЛПИ [17,19].

Таблица 5

Классификация ХАН нижних конечностей по Fontaine

Степень	Симптоматика	Дополнительные критерии
I	Асимптомная стадия или перемежающаяся хромота, возникающая при ходьбе обычным шагом на расстояние более 1000 метров.	ЛПИ>0,9, нормальный тредмил-тест
IIa	Перемежающаяся хромота, возникающая при ходьбе на расстояние от 200 до 1000 метров	ЛПИ-0,7-0,8; дистанция ходьбы при стандартном тредмил-тесте не менее 200 метров и время восстановления ЛПИ менее 15,5 мин
IIб	Перемежающаяся хромота, возникающая при ходьбе на расстояние до 200 метров	ЛПИ меньше 0,7; дистанция ходьбы при стандартном тредмил-тесте менее 200 метров и время восстановления ЛПИ до исходных значений более 15,5 мин
III	Боли в покое	Лодыжечное давление в покое <50 мм рт.ст., регистрируется коллатеральный тип кровообращения или артерии не лоцируются, пальцевое давление <30 мм рт.ст.
IVa	Трофические нарушения ограниченные	Лодыжечное давление в покое <50 мм рт.ст., регистрируется коллатеральный тип кровообращения или артерии не лоцируются, пальцевое давление <30 мм рт.ст.
IVб	Трофические нарушения распространенные	

Пояснение к таблице: ЛПИ - лодыжечно-плечевой индекс.

2.4.2. Лабораторные исследования.

Всем пациентам групп обследования проводился общий анализ крови (ОАК).

Оценивались следующие биохимические показатели крови: общий белок, г/л; креатинин крови, мкмоль/л с расчетом СКФ по формуле СКД EPI, мл/мин; холестерин, ммоль/л; липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), ммоль/л; липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), ммоль/л; индекс атерогенности (ИА); липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л, триглицериды (ТГ), ммоль/л.

Проводилось изучение следующих показателей коагулограммы: активированного парциального тромбoplastинового 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.

2.4.3. Инструментальное обследование.

2.4.3.1. Ультразвуковое исследования (УЗИ) сердца и сосудов.

Для работы использовался ультразвуковой (УЗ) сканер экспертного класса VIVID 7 Pro/ VIVID 7 VT-03 Vantage.

Стандартный протокол УЗИ сердца представлен ниже (протокол 1).

*МИТРАЛЬНЫЙ КЛАПАН: качественная оценка поражения створок (утолщение, уплотнение кальциноз), наличие или отсутствие регургитации (степень), максимальное и среднее давление на клапане, оценка трансмитрального потока (Е, А, Е/А, время замедления потока). АОРТА: диаметр на уровне синусов Вальсальвы (в норме 2,4-3,9 см), диаметр на уровне восходящего отдела (в норме 2,2-3,4 см). КЛАПАН АОРТЫ: качественная оценка поражения створок (утолщение, уплотнение, кальциноз), регургитация(степень), среднее и максимальное давление на клапане, систолическое расхождение створок (в норме 1,5-2,6 см). ТРЕХСТВОРЧАТЫЙ КЛАПАН: качественная оценка поражения створок (уплотнение, кальциноз), регургитация (степень). КЛАПАН ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ (ЛА): систолическое (в норме 20-30 мм рт.ст.), среднее давление ЛА (СДЛА) (в норме 10-18 мм рт.ст.), диаметр нижней полой вены (НПВ) (в норме 1,1-2,5 см), ее коллабирование. ЛЕВЫЙ ЖЕЛУДОЧЕК: конечный диастолический размер (КДР) (в норме 3,7-5,5 см), индекс КДР (ИКДР) ($\text{КДР}/\text{площадь тела}$) конечный систолический размер (КСР) (в норме 2,3-4,0 см), конечный систолический объем (КСО), в мл; конечный диастолический объем (КДО), в мл. ПРАВЫЙ ЖЕЛУДОЧЕК (ПЖ): диаметр (в норме до 3 см). МЕЖЖЕЛУДОЧКОВАЯ ПЕРЕГОРОДКА (МЖП): (в норме 0,7-1,1 см). ЗАДНЯЯ СТЕНКА левого желудочка (ЗСЛЖ): (в норме 0,7-1,1 см); Средняя толщина стенки (СТС) (определялась по формуле: $\text{толщина МЖП} + \text{толщина ЗСЛЖ}/2$), индекс относительной толщины стенки (ИОТС) (определялась по формуле: $2 * \text{толщину ЗСЛЖ}/\text{КДР}$). ЛЕВОЕ ПРЕДСЕРДИЕ (ПП): линейные размеры (в норме 2,4-4,0 см), площадь (в норме 9-19,3 см²) ПП - линейные размеры (в норме 2,9-4,5 см). ПЕРИКАРД: оценка состояния. ФРАКЦИЯ ВЫБРОСА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА (ФВ ЛЖ),%: (оценка по формуле: $(\text{КДО} - \text{КСО})/\text{КДО}$). ОЦЕНКА ГЛОБАЛЬНОЙ И ЛОКАЛЬНОЙ СОКРАТИМОСТИ. Расчет массы миокарда ЛЖ (ММЛЖ) (по формуле: $\text{ММЛЖ} = 0,8 * (1,04 * [(\text{КДР} + \text{толщина ЗСЛЖ} + \text{толщина МЖП})^3 - (\text{КДР})^3]) + 0,6$ грамм), индекс ММЛЖ, г/м² (определялся по формуле $\text{ММЛЖ}/\text{площадь тела}$). УДАРНЫЙ ОБЪЕМ (УО) ЛЖ, мл.*

Протокол 1. Протокол эхокардиографии с доплеровским анализом

На основании УЗИ сердца определялось: отсутствие морфо-функциональных изменений, бессимптомная дисфункция левого желудочка (ЛЖ), адаптивное и дезадаптивное ремоделирование сердца [11].

У части пациентов проводилось дуплексное сканирование (ДС) и УЗ доплерография (ДГ) артерий брахиоцефальных и нижних конечностей.

Оценивали ТИМ, наличие или отсутствие атеросклеротической бляшки, ее структуру, определяли степень стеноза и особенности строения сосудов.

Сканирование общей сонной артерии (ОСА) проводили в В-режиме с цветовым доплеровским картированием потока. ТИМ измеряли в продольном сечении в дистальной трети общей сонной артерии ОСА. При исследовании учитывали, что при ультразвуковой визуализации, ближайшая и отдаленная стенки артерий (относительно датчика) имеют 2 эхогенные линии, разделенные гипоехогенным пространством. Внешняя линия соответствует границе слоев меди и адвентиции, внутренняя – границе просвета артерии и слоя интимы. Пространство между данными линиями соответствует комплексу интима-медиа, а расстояние между ними – ТИМ.

ТИМ измеряли по задней стенке ОСА на расстоянии 1,0-1,5 см ниже области бифуркации. Ультразвуковой датчик устанавливали на границу раздела адвентиция-медиа и интима-просвет стенки артерии. Процент стеноза определяли в зоне, соответствующей максимальному сужению просвета артерии. Стеноз 60% и более по диаметру считали гемодинамически значимым. При наличии атеросклеротической бляшки в просвете ОСА ТИМ определяли на интактном (свободном) от атеросклеротической бляшки участке. Критерием наличия атеросклероза в ОСА считали локальное утолщение ТИМ более 1,5 мм, либо увеличение высоты на 0,5 мм или на 50% относительно прилежащих сегментов (эквивалент атеросклеротической бляшки, в соответствии с национальными и европейскими рекомендациями [6]).

На основе эхогенности и однородности структуры выделяли следующие типы атеросклеротических бляшек:

I тип - «мягкая» гомогенная бляшка (однородная эхонегативная);

II тип - гетерогенная гипоэхогенная бляшка (эхонегативная с содержанием гипоэхогенных зон более 50%);

III тип - гетерогенная гиперэхогенная бляшка (эхопозитивная с содержанием гиперэхогенных зон более 50%);

IV тип - «плотная» гомогенная бляшка (однородная эхопозитивная);

V тип - неклассифицируемая вследствие выраженного кальциноза, формирующего акустическую тень [6].

В режиме ДГ определялась линейная скорость кровотока (ЛСК). Отдельно оценивался ЛПИ.

ЛПИ – это показатель, характеризующий адекватность артериального кровотока в нижних конечностях. ЛПИ рассчитывали по формуле: отношение систолического артериального давления на лодыжке к систолическому артериальному давлению на плече. Ишемия конечности проявляется при значении $ЛПИ < 0,9$. У пациентов с $ЛПИ < 0,5$ отмечают более частые ишемические боли в покое и повреждения тканей. Критическая ишемия нижних конечностей характерна при $ЛПИ < 0,4$, трофические язвы появляются при ЛПИ менее 0,3 [19].

2.4.3.2. Ангиографические исследования (Innova 4100IQ GENERAL ELECTRIC).

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

2.4.4. Специальные методы исследования.

Эти методы включали исследование сывороточной концентрации ряда белков и цитокинов посредством иммуноферментного анализа (ИФА), определение ЛВСЛ, а также специально разработанный для этого исследования метод определения посредством ИФА содержания белков в лейкоцитарных супернатантах.

2.4.4.1. Определение концентрации белков и цитокинов в сыворотке крови ИФА. В таблице 6 приводятся данные об исследуемых белках и цитокинах, их нормативных диапазонах в сыворотке крови, производителях наборов для ИФА.

Таблица 6

Нормативный диапазон содержания исследуемых биомаркеров в сыворотке крови

П\п	Показатель	Торговое название	Производитель	Содержание в сыворотке (нормативный диапазон)
1.	Дефензин-альфа (1-3)	Human HNP 1-3	Hycult biotech	50-100 нг/мл (пг/мл)
2.	Липопроtein а	Human Lipoprotein (a)	Assay Max	2,5-25 нг/мл
3.	C-реактивный белок	High Sensitivity Enzyme Immunoassay for the Quntitative Determination of C-Reactive Protein concentration in Human Serum	Biomerica	0-3 мг/л
4.	N-терминальный предшественник мозгового натрийуретического пептида	NT-proBNP	Biomedica Slovakia	0-112 пг/мл
5.	Фактор Виллебранда	ФВ:Ag	Technozym	0,5-1,5 ЕД/мл
6.	Белок, связывающий жирные кислоты	Human H-FABR	Hycult biotech	3,55-6,32 нг/мл
7.	VII фактор свертываемости крови	Factor VII(F VII)	AssayPro	10-100 нг/мл
8.	Интерлейкин 6	Human ИЛ-6 High Sensitivity	eBioscience	до 5,9 пг/мл
9.	Интерлейкин 8	Human ИЛ-8/Nap-1	eBioscience	до 62 пг/мл
10.	Фактор некроза опухоли альфа	ФНО-α	Вектор Бест	0-6 пг/мл

2.4.4.2. Липидвысвобождающая способность лейкоцитов (ЛВСЛ).

У всех пациентов проводилось определение ЛВСЛ сыворотки крови в иммунологической лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава по авторскому методу А.В. Туева, В.Ю. Мишланова (патент № 2194995, 2002 г.). Для этого из венозной крови больного в стерильных условиях выделяли лейкоцитарную взвесь, используя вакутейнеры с декстрозой. Полученную суспензию лейкоцитов отмывали путем ресуспендирования в физиологическом растворе хлорида натрия с последующим центрифугированием для осаждения клеток, второй раз отмывку производили в питательной среде Игла. После отмывки лейкоциты ресуспендировали в питательной среде Игла. Производился количественный подсчет клеток и готовилась взвесь, содержащая 50 000 лейкоцитов в 1 мкл среды. Соотношение лейкоцитов в выделенной суспензии приближалось к таковому в цельной крови, т.е. значительно

преобладали нейтрофилы (60-80 %). На следующем этапе 400 мкл суспензии лейкоцитов культивировали при 37°C в течение 3 суток в неполной питательной среде в пенициллиновых флаконах. Через 3 суток определяли в культуральной среде содержание общего холестерина в надосадочной жидкости холестериноксидазным методом. Полученная в результате концентрация общего холестерина обозначалась как ЛВСЛ.

2.4.4.3. Определение содержания белков в супернатантах лейкоцитарных культур.

Для решения цели и задач исследования была разработана и запатентована методика определения содержания белков в лейкоцитарных супернатантах.

Прототипами послужили методики изучения ЛВСЛ и ИФА [4].

Способ осуществляли следующим образом. Лейкоциты выделяли из венозной крови с помощью системы Vacutainer BD, содержащей декстрозу. Клеточную суспензию отмывали физиологическим раствором натрия хлорида, затем питательной средой Игла-МЕМ. Осуществляли подсчет количества клеток и доводили их концентрацию до 50000 в 1 мкл, что обеспечивало тесный клеточный контакт при культивировании лейкоцитов. Суспензию лейкоцитов в количестве 400 мкл помещали в стерильные пенициллиновые флаконы, закрывали резиновыми пробками. Культивирование клеточной суспензии, обогащенной лейкоцитами, осуществлялось в среде Игла-МЕМ в течение 72 часов при 37 °С. Затем молекулярную диагностику проводили методом ИФА, например, используя наборы фирмы Nuscult Biotech для определения концентрации дефензинов альфа (1-3) и/или наборы фирмы Biomerica для определения СРБ. При этом, для повышения чувствительности методики и достижения оптимального соотношения антигена и моноклональных антител (конъюгата) в случае определения концентрации СРБ разведение биологического материала не применялось, в отличие от рекомендованного 100 кратного при изучении в сыворотке крови. При определении содержания альфа-дефензинов образцы разводили в 100 раз.

2.4.4.4. Экспериментальное исследование.

Из венозной крови с помощью системы Vacutainer BD, содержащей декстрозу, выделяли лейкоциты. Клеточную суспензию отмывали физиологическим раствором натрия хлорида, затем питательной средой Игла-МЕМ. Осуществляли подсчет количества клеток и их коррекцию до 50000 в 1 мкл. Полученную суспензию лейкоцитов в количестве 400 мкл помещали в 2 стерильных пенициллиновых флаконах. 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 (схема 2). 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 (схема 2). В дальнейшем производился статистический анализ содержания белков в первой и второй пробах.

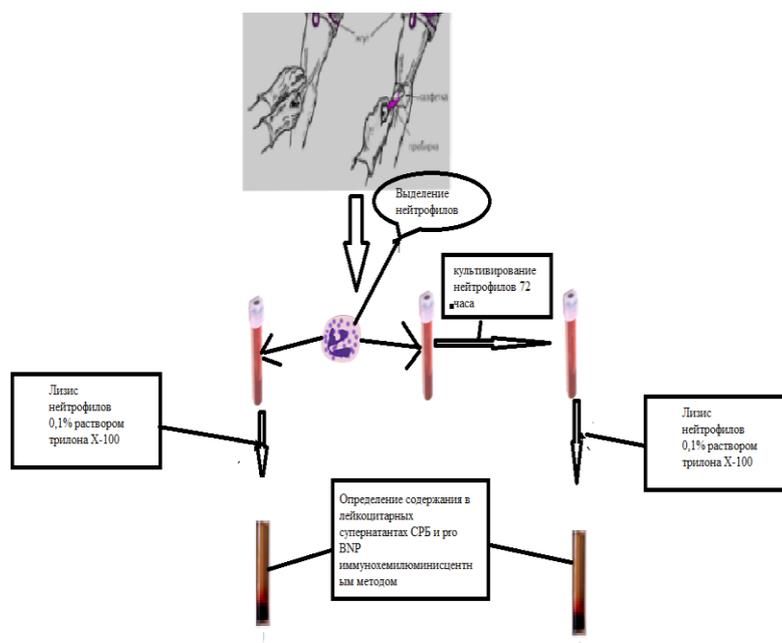


Схема 2. Эксперимент с лейкоцитами больных ИБС in vitro

2.4.5. Статистическая обработка результатов.

Статистическая обработка результатов производилась при помощи программного пакета Статистика 8.0. Исходно определяли объем выборки для достижения мощности исследования 70% и 90% по показателю ЛВСЛ, дисперсия и средние значения которого были определены в предыдущих работах для пациентов с ИБС и здоровых лиц. Результаты этого этапа статистического анализа приведены в начале главы.

При выявлении закона распределения соблюдался следующий порядок:

- подготовка опытных данных;
- построение гистограмм (полигонов) количественных характеристик (см. таблицы 10-12);
- 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* по следующему принципу. Для среднего значения определяли *предельную ошибку выборки* по формуле: $\Delta \tilde{x} = |\bar{x} - \tilde{x}|$,

где $\tilde{x} = \sum x_i / N_x$, N_x - объем выборки.

Грубые ошибки и промахи обнаруживали и исключали из расчетов следующим образом:

- находили среднее арифметическое \bar{x} результата n-кратного измерения величины x_i ;
- определяли среднее квадратическое отклонение S ;
- вычисляли вспомогательную величину $t(S)$ (по таблице).

При $|\bar{x} - \tilde{x}| > t(S)$ результат измерения x_i является грубой ошибкой, поэтому его исключали из расчетов и среднее значение \bar{x} вычисляли заново для оставшихся достоверных результатов измерения.

Во всех группах обследования и сравнения критерий Колмогорова-Смирнова имел P более 0,05, а гистограммы признаков носили негауссоновский характер. Таким образом, распределение признаков среди обследуемых в большинстве случаев имело экспоненциальный или усеченный нормальный характер.

Количественные признаки представлялись в виде - средняя (M), percentile 10%, percentile 90%, среднеквадратичное отклонение (SD).

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) [82]. На осях откладывалась 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.

Определяли следующие параметры:

- диагностическая чувствительность (Se) – способность выявить максимальное количество больных из числа обследованных, $a/(a+c)$ в %;

- диагностическая специфичность (Sp) - способность выявить максимальное количество здоровых из числа обследованных, $d/(d+b)$ в %;

- Прогностичность (P) – способность выявить пациентов, у которых будет выявлено заболевание; PPV - вероятность заболеть при носительстве признака, $a/(a+b)$ в %; NPV - вероятность не заболеть при отсутствии признака, $d/(d+c)$ в %;

•Отношение шансов (OR) – это отношение шанса наступления исхода в группе воздействия определенного фактора к шансу наступления исхода в контрольной группе, ad/bc ;

где a – это количество истинно положительных результатов, b – это количество ложно - положительных результатов, c – это количество ложно - отрицательных результатов, d – это количество истинно отрицательных результатов исследования. [18,23].

Для ранжирования полученных отличий использовался принцип Парето с построением диаграммы Парето. Диаграмма Парето представляет собой столбчатую диаграмму, по горизонтали оси которой откладываются наименования анализируемых факторов в определенном порядке, а по вертикальной – значения каждого из факторов в безразмерных единицах (%).

Для оценки статистической значимости патерна изучаемых факторов применялся метод логистической регрессии. Для решения этой задачи на первом этапе происходило построение линейной множественной регрессии вида (формула 2):

$y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$, (2), где y – многопараметрический показатель здоровья, x_i , $i = \overline{1, n}$ – диагностические показатели.

Зависимая переменная y по сути является бинарной, то есть может принимать только два значения 1 и 0 – принадлежность к первой группе (больные) или второй (здоровые). Однако, в линейной модели (1) значение y может выйти за рамки интервала от 0 до 1. Для решения этой проблемы, применяется логит-преобразование (формула 3):

$p = \frac{1}{1 + e^{-y}}$, (3), где p – вероятность наступления события для конкретного индивида.

В последующем применялся 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.

На завершающем этапе исследования ретроспективно определена мощность исследования по имеющимся дисперсиям и средним. Оказалось, что для всех показателей специальной части обследования мощность исследования была выше 80%.

ГЛАВА 3

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНЬЮ БЕЗ КЛИНИЧЕСКИХ И УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ПРИЗНАКОВ
АТЕРОСКЛЕРОЗА**

Анализ результатов исследования гемограммы показал отсутствие в группе больных ГБ отклонений от нормативного диапазона и значений группы практически здоровых лиц (таблица 7).

Таблица 7

Гемограмма у больных ГБ без клинических проявлений атеросклероза и у здоровых лиц			
	Группа больных ГБ - Median (percentel 10/90) (n-25)	Группа сравнения - Median (percentel 10/90)(n-33)	P
Эритроциты, 10^{12} в л	4,64 (4,22;5,00)	4,97 (4,38;5,67)	0,8
Гемоглобин, г/л	138,27 (123,00; 150,00)	142,13 (126,00; 158,00)	0,9
Лейкоциты, 10^9 в л.	7,36 (5,30; 10,50)	6,13 (4,93; 8,30)	0,8
Сегментоядерные нейтрофилы, %	62,33 (49,00;71,00)	64,78 (51,00;73,00)	0,7
Сегментоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	3,57 (2,50;6,59)	3,44 (2,37;6,11)	1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,57 (0,00;7,00)	2,24 (0,00;5,00)	1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	0,10 (0,00;0,29)	0,09 (0,00;0,24)	0,9
Лимфоциты, %	25,53 (13,00;38,00)	26,89 (18,00;34,00)	0,9
Лимфоциты, 10^9 в л.	1,44 (0,80;3,15)	1,51 (0,97;2,99)	0,8
моноциты, %	6,47 (4,00;10,00)	5,68 (3,00;8,00)	0,8
Моноциты, 10^9 в л.	0,38 (0,19;0,82)	0,33(0,15;0,71)	0,7
СОЭ, мм/час	9,82 (4,00;21,00)	7,54 (3,00;17,00)	0,8
Тромбоциты, 10^9 в л.	267,43 (214,0;347,0)	287,25 (226,0;351,0)	0,8

Включенные в исследование пациенты с ГБ имели умеренно выраженную дислипидемию преимущественно 2а и 2б типа по Фредриксону (см. таблицу 8).

Анализ средних значений коагулограммы больных ГБ показал наличие признаков гиперкоагуляции и угнетения фибринолиза (таблица 9).

Липидограмма у больных ГБ (n=25)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Холестерин, ммоль/л	7,00	5,70	8,70	1,10
ЛПВП, ммоль/л	1,51	1,15	1,90	0,27
ТГ, ммоль/л	2,16	0,94	5,57	1,51
ЛПОНП, ммоль/л	0,77	0,43	1,27	0,30
ИА	3,52	2,23	4,36	0,72
ЛПНП, ммоль/л	4,46	3,62	5,97	0,87

Таблица 9

Коагулограмма у больных ГБ (n=25)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
АПТВ, сек	25,57	24,00	28,00	1,40
ПТВ, сек	17,57	15,00	28,00	4,65
АДФ, сек	13,57	11,00	16,00	2,07
ХЗФ, мин	21,29	10,00	58,00	16,80

Среди пациентов с ГБ 86% не имели морфо-функциональных нарушений сердца, а 14% соответствовали критериям бессимптомной дисфункции миокарда (БДМ) [11]. Средние значения ультразвуковых показателей (таблица 10) были в нормативной зоне.

Таблица 10

Результаты ультразвукового исследования сердца у больных ГБ (n=25)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ЛП, мм	36,65	29,00	46,00	6,66
КСО, мл	45,20	32,50	62,00	11,26
КДО, мл	111,99	83,07	135,34	21,30
КСР, см	3,38	3,00	3,90	0,37
КДР, см	4,86	4,30	5,30	0,41
ПЖ, см	2,37	1,90	2,70	0,34
ФВ %	57,73	50,00	65,00	5,92
МЖП, мм	11,42	9,00	11,00	1,93
ЗСЛЖ, мм	11,00	9,00	13,00	1,32
Средняя толщина стенок ЛЖ, см	1,12	0,95	1,35	0,14
ИОТС	0,45	0,40	0,53	0,05
ИММЛЖ, г/м ²	100,78	71,00	141,00	29,72
ПП, мм	33,14	30,00	38,00	3,18
НПВ, мм	16,00	12,00	18,00	2,10
СДЛА, мм рт ст	3,21	0,90	12,00	4,17

Проведенный корреляционный анализ выявил обратную сильную взаимосвязь ФК ХСН (по данным теста 6 минутной ходьбы с on-line мониторингом ЧСС) с ФВ ЛЖ ($R=-0,7$, $p=0,04$) и прямую умеренной силы с толщиной МЖП ($R=0,5$, $p=0,03$).

У всех пациентам с ГБ без клинических проявлений атеросклероза были изучены следующие показатели, составляющие специальную часть исследования:

- 1) определение посредством ИФА сывороточной концентрации СРБ, ЛПа, VII фактора свертывания, дефензинов альфа (1-3 типа), NT –proBNP, БСЖК), ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-альфа (таблица 11);
- 2) изучение ЛВСЛ по методике А.В. Туева, В.Ю. Мишланова (таблица 11);
- 3) определение содержания белков (СРБ, ЛПа, VII ф, дефензинов альфа (1-3 типа), NT-proBNP, БСЖК) в лейкоцитарных супернатантах с использованием ИФА (таблица 11).

Данные исследований содержания белков и цитокинов показали, что у больных ГБ средняя концентрация в сыворотке крови СРБ и ЛПа превышала нормативный диапазон, а уровень ФНО-альфа был на верхней границе нормы (см. таблицу 6, глава 2).

Таблица 11

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

Показатель	Группа больных ГБ Median (percentel 10/90) (n=25)	Здоровые лица Median (percentel 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
ЛПа в сыворотке, нг/мл	39,89 (22,05/68,75)	8,68 (5,66/8,68)	0,04
ЛПа 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-proBNP в сыворотке, пг/мл	142,33 (10,00/151,50)	39,38(0/120,35)	0,16
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	138,14 (47,46/277,98)	18,25 (0/35,39)	0,03
Дефензины в сыворотке, пг/мл	6577,54 (3390,80/11296,00)	626,37 (270,40/1376,00)	0,01
Дефензины в супернатанте, пг/мл	518428,6 (109300,00/863000,00)	117206,1(11420/200000)	0,05
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

Проведено сравнение полученных результатов с данными здоровых лиц (см. таблицу 11). Результаты данного анализа показали, что у больных ГБ по

сравнению со здоровыми лицами, содержание в сыворотке ЛПА и дефензинов-альфа было достоверно выше. Это свидетельствует о тромбофилии и напряжении противомикробной защиты. При этом в лейкоцитарных супернатантах больных ГБ выявлялась значимо более высокая концентрация NT-proBNP и дефензинов, чем у здоровых, что может указывать на изменение способности лейкоцитов к высвобождению факторов противoinфекционной защиты и адаптивных молекул.

Проведена оценка разделительной эффективности полученных различий между группами больных ГБ и практически здоровых лиц путем построения ROC кривых (таблица 12, диаграмма 15).

Таблица 12

Результаты ROC анализа различий содержания биомаркеров в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах у больных ГБ и здоровых лиц

Показатель	ЛВСЛ, ммоль/л	NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	Дефензины в сыворотке, пг/мл	дефензины в супернатанте, пг/мл	ИЛ 8 в сыворотке пг/мл
TP (True Positives)/FP (False Positives)	8,00	8,00	10,00	5,00	13,00
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	21,00	2,00	0,00	5,00	10,00
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	0,28	0,80	1,00	0,50	0,57
AUC (площадь под графиком)	0,53	0,84	1,00	0,72	0,66
Максимум sp+se	1,17	1,72	2,00	1,50	1,41
Значение показателя в максимуме	0,14	21,00	1300,00	210000,00	3,39
Чувствительность в максимуме	0,34	0,80	1,00	0,50	0,57
Специфичность в максимуме	0,83	0,84	1,00	1,00	0,85

Анализ значения AUC (диаграмма 15, таблица 12) показал, что точками разделения между здоровыми и больными ГБ являются концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови более 1300 пг/мл (отличные операционные характеристики) и ИЛ-8 более 3,39 пг/мл (средние операционные характеристики), а в лейкоцитарных супернатантах содержание NT-proBNP превышающее 21 пг/мл (очень хорошие операционные характеристики) и дефензинов – более 210000 пг/мл (хорошие операционные характеристики). Значение ЛВСЛ более 0,14 ммоль/л имело неудовлетворительные разделительные свойства.

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 NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах - в 84%, дефензинов-альфа - в 50%, а значение ЛВСЛ только в 32% случаев (диаграмма 2). Данные результаты свидетельствуют о том, что у пациентов с доклинической стадией атеросклероза преобладают провоспалительные процессы и изменение белокпродуцирующей функции лейкоцитов предшествует активации ЛВСЛ. (диаграмма 16).

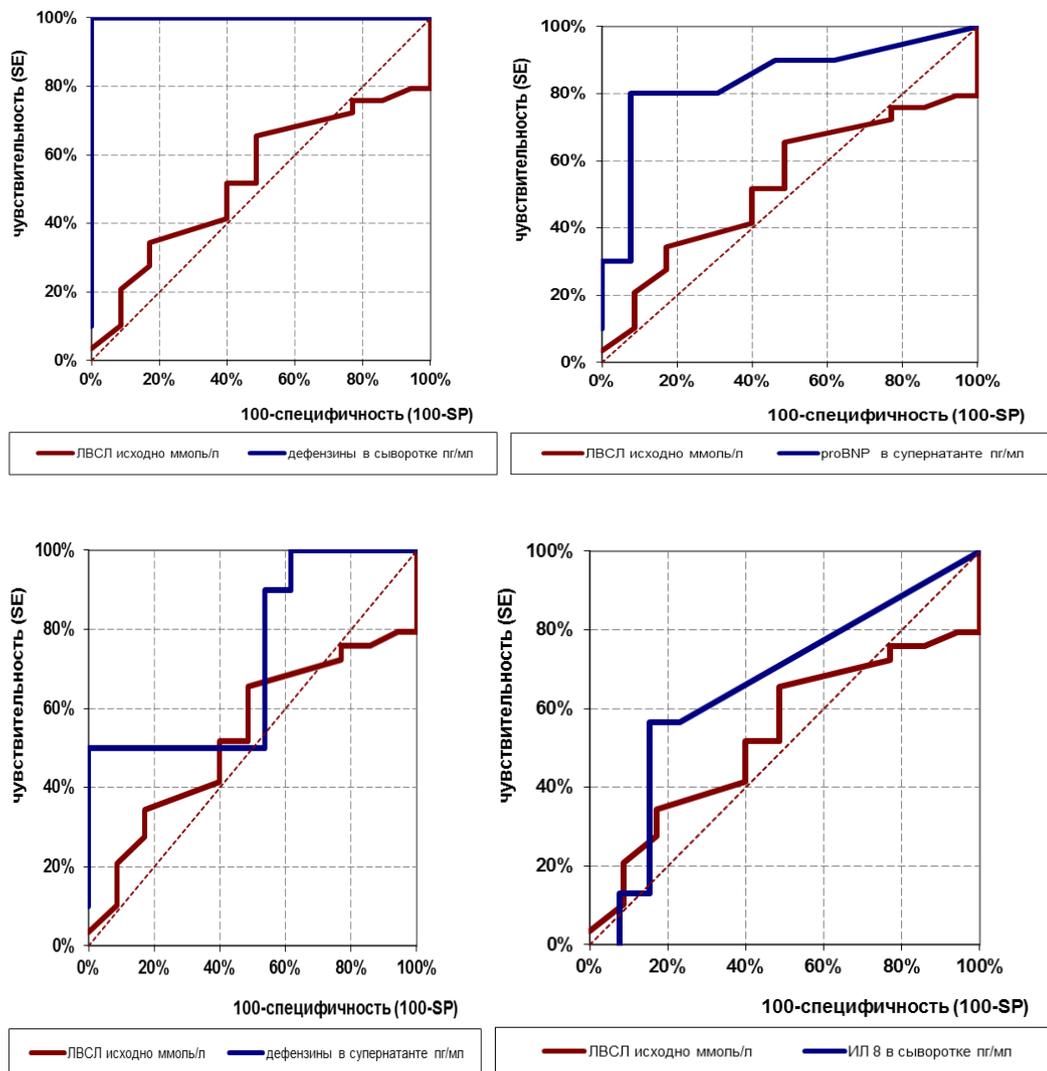


Диаграмма 15. ROC кривые, построенные по изучаемым показателям, у больных ГБ

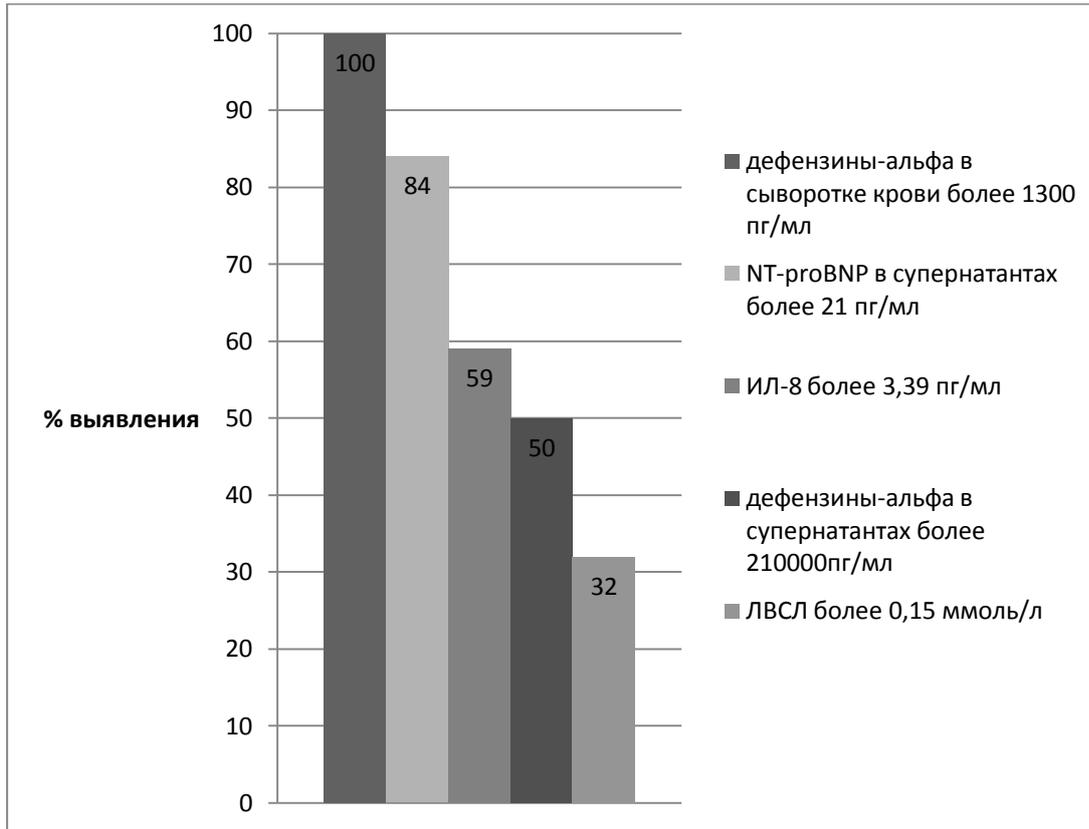


Диаграмма 16. Диаграмма Парето, построенная по частоте выявления высоких значений сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ГБ

Для комплексной оценки значимости различий паттерна белково-пептидных факторов больных ГБ и здоровых лиц выбраны: концентрация в супернатантах NT-proBNP, а также сывороточное содержание дефензинов. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии: $y = -22,625 + 0,1031112 \cdot x_1 + 0,004459916 \cdot x_2$, где x_1 - концентрация в супернатантах NT-proBNP, x_2 - сывороточная концентрация дефензинов, ($p(\text{правдоподобия}) = 0,0001$). Данная двухкомпонентная модель имела отличную статистическую значимость по результатам проведенного ROC анализа (AUC-0,99) (таблица 13, диаграмма 17)

Результаты ROC анализа разделительной эффективности комплексной оценки сывороточных и лейкоцитарных факторов больных ГБ и здоровых лиц

Показатель	значение
TP (True Positives)/FP (False Positives)	9
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	1
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	90,00%
AUC (площадь под графиком)	0,95
Максимум sp+se	1,90
Значение показателя в максимуме	0,01
Чувствительность в максимуме	0,90
Специфичность в максимуме	1,00

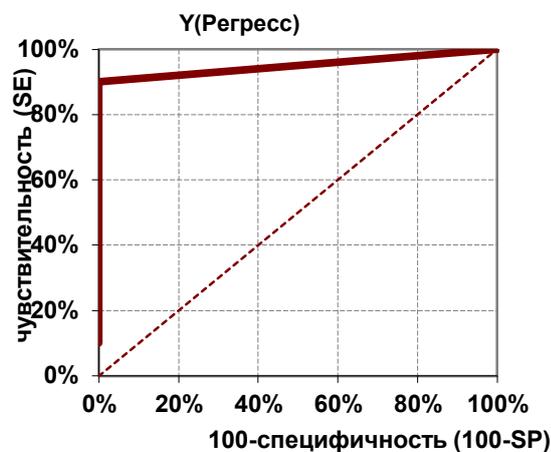


Диаграмма 17. ROC кривая, построенная по значению γ у больных ГБ

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

В группе больных ГБ выполнен анализ взаимосвязей изучаемых признаков. Результаты представлены в таблицах 14-16.

Выявлено, что концентрации дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах и ФНО-альфа в сыворотке имеют сильную прямую связь ($R=0,72$, $p=0,02$). Показано, что содержание в сыворотке крови ИЛ-6 связано с процентом моноцитов крови, ИЛ-8 – с содержанием нейтрофилов в крови, а ФНО-альфа с лимфоцитами (сильная прямая связь) (таблица 16). Оценка взаимосвязи

изучаемых показателей с УЗ параметрами сердца установила, что величина ЛВСЛ имеет умеренной силы прямую связь с размерами левых отделов сердца (КДР, КДО, линейный размер левого предсердия) (см. таблицу 14); концентрация СРБ и ИЛ-6 в сыворотке - прямую связь с толщиной стенки ЛЖ (толщина МЖП, ОТС) (см. таблицу 15-16), а содержание ИЛ-6 и ФВ ЛЖ - умеренной силы обратную связь (см. таблицу 16).

Определена прямая сильная связь концентрации холестерина крови и ЛВСЛ ($R=0,78$, $p=0,02$), содержания в супернатантах СРБ и триглицеридов (ТГ) ($R=0,78$, $p=0,04$), концентрации NT-proBNP в супернатантах и ЛПВП в сыворотке крови ($R=0,8$, $p=0,02$), креатинина и ЛПА сыворотки ($R=0,71$, $p=0,05$), глюкозы и VПф в сыворотке крови ($R=0,88$, $p=0,004$).

Таблица 14

**Корреляции величины ЛВСЛ у больных ГБ с показателями УЗИ сердца
(критерий Спирмана)**

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ЛВСЛ, ммоль/л	Линейный размер ЛП, мм	0,94	0,0015
ЛВСЛ, ммоль/л	КДО ЛЖ, мл	0,48	0,0245
ЛВСЛ, ммоль/л	КДР ЛЖ, мм	0,46	0,0298

Таблица 15

**Корреляции содержания С-реактивного белка в сыворотке крови больных ГБ с показателями УЗИ сердца
(критерий Спирмана)**

Показатель 1	Показатель 2	R	p
СРБ в сыворотке, мг/л	МЖП, мм	0,77	0,0418
СРБ в сыворотке, мг/л	относительная толщина стенок, см	0,82	0,0244

Таблица 16

Корреляции содержания цитокинов в сыворотке крови с другими изучаемыми лабораторными и инструментальными показателями у больных ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	моноциты крови, %	0,65	0,0153
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	Размер ПЖ, мм	0,52	0,0185
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	ФВ ЛЖ, %	-0,49	0,0292
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	МЖП, мм	0,46	0,0454
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	Количество сегментоядерный нейтрофилов, 10^9 в л	0,78	0,0001
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	МЖП, мм	-0,74	0,0006
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	СДЛА, мм рт ст	-0,61	0,0205
ФНО в сыворотке, пг/мл	Количество лимфоцитов крови, 10^9 в л	0,76	0,0274

Резюме

Таким образом, у больных ГБ, в сравнении со здоровыми лицами, отмечались более высокие концентрации дефензинов-альфа и ИЛ-8 в сыворотке, а

в лейкоцитарных супернатантах – дефензинов-альфа и NT-proBNP. При этом, величина ЛВСЛ у больных с доклинической стадией атеросклеротического поражения значимо не отличалась от таковой здоровых лиц. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация в сыворотке дефензинов-альфа и NT-proBNP в супернатантах) для создания оптимальной математической модели, характеризующей белково-пептидный паттерн у больных ГБ. Для показателей, включенных в построенную модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение концентрации NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах и дефензинов в сыворотке крови на 1% приводит к росту значения γ на 0,24% и 0,76% соответственно.

Выявлена взаимосвязь величины ЛВСЛ, концентрации в супернатантах ряда белковых факторов (СРБ и NT-proBNP) и «традиционных» показателей липидного спектра (Хс, ТГ).

ГЛАВА 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРТЕНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

4.1. Результаты исследования в общей группе больных ишемической болезнью сердца в сочетании с гипертонической болезнью

Анализ гемограмм больных ИБС позволяет говорить о наличии у этих пациентов умеренного нейтрофильного лейкоцитоза (по средним показателям) (таблица 17), однако достоверных отличий по данному показателю от группы практически здоровых лиц не получено из-за большой дисперсии признака.

Таблица 17

Гемограмма у больных ИБС в сочетании с ГБ и у здоровых лиц

	Группа больных ИБС в сочетании с ГБ - Median (percentel 10/90) (n-66)	Группа сравнения - Median (percentel 10/90)(n-33)	P
Эритроциты, 10^{12} в л	4,33 (3,25;5,28)	4,97 (4,38;5,67)	0,8
Гемоглобин, г/л	130,49 (119,00; 158,00)	142,13 (126,00; 158,00)	0,9
Лейкоциты, 10^9 в л.	7,94 (5,50; 11,30)	6,13 (4,93; 8,30)	0,8
Эозинофилы, %	3,00 (0,00;8,00)	3,1 (0,00;5,00)	0,8
Эозинофилы, 10^9 в л	0,25 (0,04;0,59)	0,78 (0,02;1,51)	0,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	63,43 (51,00;77,00)	64,78 (51,00;73,00)	0,7
Сегментоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	3,85 (3,23;7,08)	3,44 (2,37;6,11)	0,07
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,10 (1,00;7,00)	2,24 (0,00;5,00)	1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	0,24 (0,06;0,48)	0,09 (0,00;0,24)	0,9
Лимфоциты, %	24,99 (12,00;39,00)	26,89 (18,00;34,00)	0,9
Лимфоциты, 10^9 в л.	1,53 (0,86;3,32)	1,51 (0,97;2,99)	0,8
моноциты, %	5,36 (2,00;9,00)	5,68 (3,00;8,00)	0,8
Моноциты, 10^9 в л.	0,36 (0,13;0,84)	0,33(0,15;0,71)	0,7
СОЭ, мм/час	9,82 (4,00;21,00)	7,54 (3,00;17,00)	0,8
Тромбоциты, 10^9 в л.	278,98 (129,0;451,0)	287,25 (226,0;351,0)	0,8

Средние значения показателей липидного спектра отличались в лучшую сторону от таковых у больных ГБ (таблица 18). Данный факт объясняется тем, что 88% больных ИБС получали статины (см. раздел 2.3.1.).

Липидограмма у больных ИБС в сочетании с ГБ (n=66)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Холестерин, ммоль/л	4,98	3,55	6,45	1,13
ЛПВП, ммоль/л	1,32	0,82	2,40	0,51
ЛПНП, ммоль/л	2,90	2,00	3,89	0,79
ТГ, ммоль/л	1,68	0,93	2,55	0,59
ЛПОНП, ммоль/л	1,03	0,35	1,35	1,40
ИА	3,49	1,98	4,60	1,42

Показатели коагулограммы позволяют говорить о наличии у данных пациентов признаков угнетения фибринолиза (таблица 19).

Таблица 19

Коагулограмма у больных ИБС в сочетании с ГБ (n=66)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
АПТВ, сек	31,92	25,00	41,00	6,18
ПТВ, сек	16,98	13,00	24,10	5,32
АДФ агрегация, сек	12,12	9,00	15,00	2,09
ХЗФ, мин	48,21	24,00	60,00	15,51

Результаты УЗИ сердца приводятся в таблице 20. Анализ средних значений позволяет констатировать наличие у больных ИБС признаков гипертрофии миокарда левого желудочка (среднее значение ИММЛЖ - 134 г/м²) и незначительного повышения среднего давления в легочной артерии (23 мм рт ст), характеризующего застой крови в малом круге кровообращения.

Таблица 20

Результаты ультразвукового исследования сердца у больных ИБС в сочетании с ГБ (n=66)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ЛП, мм	39,36	32,00	47,00	6,32
Объем ЛП, мл	51,76	37,00	68,00	11,45
КСО, мл	47,33	34,00	62,00	13,78
КДО, мл	125,0	88,0	209,0	48,55
КСР, см	3,69	2,80	5,20	0,82
КДР, см	5,02	4,40	6,40	0,76
ИКДР, см/м ²	2,59	2,26	2,94	0,27
ПЖ, см	3,09	2,10	3,20	3,44
ФВ %	53,97	44,00	64,00	9,75
МЖП, мм	11,38	9,00	14,00	2,14
ЗСЛЖ, мм	11,16	9,00	13,00	1,62
Средняя толщина стенок ЛЖ, см	1,13	0,90	1,30	0,18
ОТС	0,45	0,33	0,58	0,10
ММ ЛЖ, г	247,47	145,67	378,17	83,26
ИММЛЖ, г/м ²	134,76	99,57	182,69	33,97
ПП, мм	38,10	30,00	46,00	6,76
НПВ, мм	15,27	13,00	18,00	2,27
ВТЛЖ, мм	19,07	16,00	22,00	2,37
СДЛА, мм рт. ст.	23,25	10,00	38,40	13,38
УО, ЛЖ, мл	62,94	49,00	82,00	17,90

На основании УЗИ сердца выделены типы морфо-функциональных нарушений (диаграмма 18). У большинства обследуемых с ИБС отмечалась БДМ (47%), дезадаптивное ремоделирование миокарда (ДРМ) отмечено только у 8% пациентов.

Анализ взаимосвязей ФК ХСН, определенного в модифицированном тесте 6 минутной ходьбы [30], с показателями УЗИ сердца выявил наличие следующих корреляций: 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 КСО ЛЖ ($R=0,45$, $p=0,03$), а также умеренной силы обратная связь с ФВ ЛЖ ($R=-0,4$, $p=0,04$).

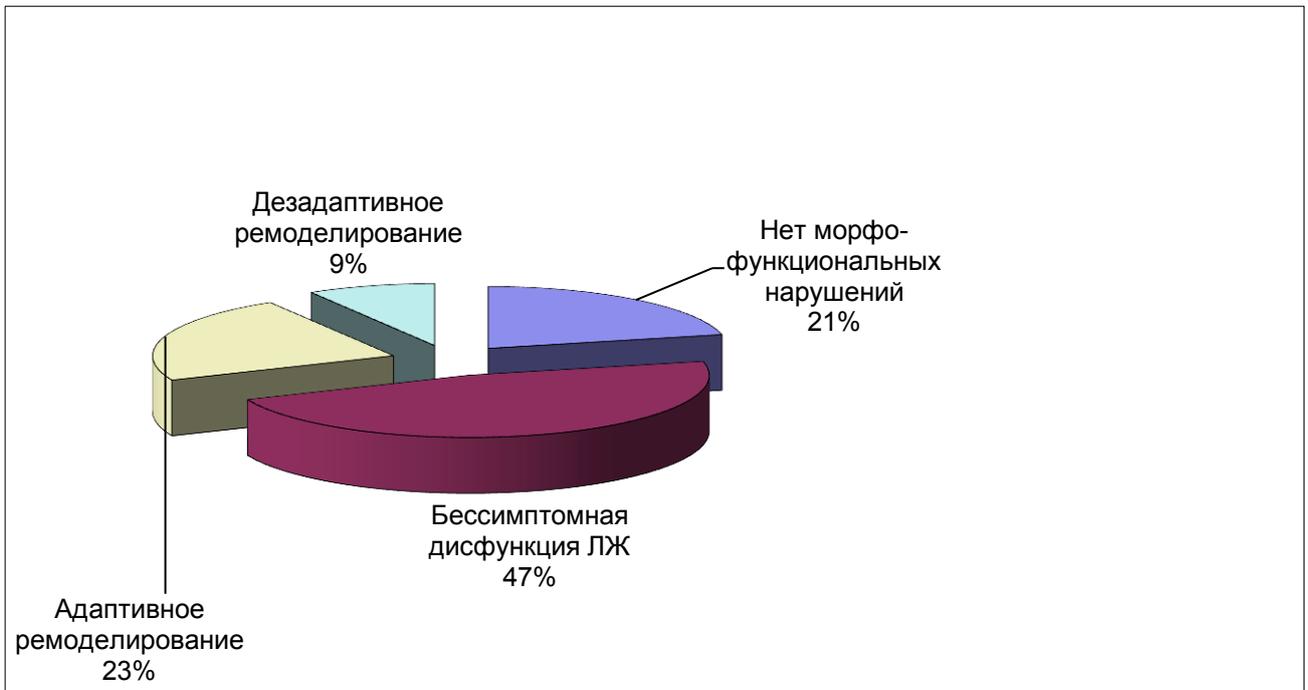


Диаграмма 18. Структура типов морфо-функциональных изменений миокарда у больных ИБС в сочетании с ГБ

При анализе результатов ангиографического исследования коронарных артерий (таблица 21) у большинства больных обнаружены признаки стенозирующего многососудистого поражения. Однако ни ФК стенокардии напряжения, ни ФК ХСН с выраженностью стеноза и количеством пораженных

артерий достоверно не коррелировали, что говорит о компенсаторной адаптации коронарного кровотока к меняющимся условиям работы сердца.

Результаты исследования содержания изучаемых биомаркеров в сыворотке крови у больных ИБС показали, что средние значения концентраций СРБ, ЛПа, NT-proBNP, дефензинов, ИЛ-6 и ФНО-альфа были выше верхней границы нормы (нормативный диапазон см. таблицу 6, глава 2). Это свидетельствует об активации провоспалительных механизмов, звеньев врожденного иммунитета и гуморальных систем, реагирующих на гемодинамическую травму. Результаты исследования концентраций изучаемых белково-пептидных факторов и величины ЛВСЛ представлены в таблице 22.

В таблице 22 приводятся данные сравнительного анализа, полученные при обработке результатов исследования больных ИБС и здоровых лиц. Показано, что содержание всех изучаемых показателей в сыворотке и супернатантах было выше у больных ИБС.

Таблица 21

Состояние коронарного кровообращения в группе больных ИБС в сочетании с ГБ (n=39)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ПМЖА прокс., %	73,08	40,00	95,00	20,87
ПМЖА сред., %	74,06	40,00	100,00	22,11
ПМЖА дист., %	68,29	47,00	98,00	17,28
ОА сред., %	76,47	40,00	102,00	22,33
ОА дист., %	59,00	50,00	65,00	6,38
ОА прокс., %	50,75	30,00	80,00	18,33
ПКА прокс. %	59,50	30,00	99,50	26,25
ПКА сред. %	71,40	40,00	100,00	24,13
ПКА дист., %	65,29	30,00	99,00	30,70
ВТК 1., %	59,29	30,00	100,00	22,07
ВТК 2., %	62,00	30,00	100,00	25,88
ЛКА., %	51,25	30,00	75,00	24,62
1 ДВ, %	64,67	40,00	99,00	21,74
ЗМЖА, %	82,50	70,00	95,00	17,68
количество шунтов	3,7	2,0000	5,000	1,274

Пояснения к таблице: ПМЖА – передняя межжелудочковая артерия, ОА- огибающая артерия, ВТК- ветвь тупого края, ЛКА- левая коронарная артерия, ПКА – правая коронарная артерия, ДВ- диагональная ветвь, ЗМЖА – задняя межжелудочковая артерия.

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 (percentel 10/90) (n=66)	Здоровые лица Median (percentel 10/90) (n=33)	Достоверность различий (N>20),p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,17 (0,09/0,25)	0,13(0,1/0,15)	0,001
СРБ в сыворотке, мг/л	6,87 (1,68/11,49)	2,30 (0,22/2,3)	0,001
СРБ в супернатанте, мкг/л	42,79 (10,4/91,2)	18,34 (1,7/32,6)	0,001
ЛПА в сыворотке, нг/мл	40,51 (29,5/40,4)	8,68 (5,66/8,68)	0,001
ЛПА в супернатанте, нг/мл	39,86 (25,3/56,3)	25,60 (13,53/45,85)	0,001
ФВ в супернатанте, ЕД/мл	1,10 (0,87/1,37)	0,04(0,01,0,05)	0,001
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	5,24 (2,79/8,63)	1,92 (0,8/1,92)	0,001
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	2,02 (0,52/4,1)	0,26 (0/0,51)	0,001
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	424,97 (29/1714)	39,38(0/120,35)	0,001
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	127,07 (11,05/222,89)	18,25 (0/35,39)	0,001
Дефензины в сыворотке, пг/мл	4928,25(1864/8192)	626,37 (270,40/1376,00)	0,001
Дефензины в супернатанте, пг/мл	654610,00(200000/949000)	117206,1(11420/200000)	0,001
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	12,70 (1,1/44,57)	1,04 (0,8/1,5)	0,001
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	39,25 (0/136,9)	5,34 (0/24,4)	0,02

Проведена оценка разделительной эффективности полученных различий содержания биомаркеров у больных ИБС и здоровых лиц посредством ROC анализа (таблица 23, диаграмма 19).

Анализ значения AUC показал, что у больных ИБС концентрации дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах выше 210000 пг/мл, NT-proBNP - более 21 пг/мл, ФВ - свыше 0,07 ЕД/мл, VIIф - более 0,64 нг/мл имеют отличную разделительную (от здоровых лиц) эффективность, СРБ более 25,33 мкг/л – очень хорошую, а ЛПА свыше 28,23 нг/мл - хорошую. Содержание в сыворотке крови дефензинов-альфа более 1700 пг/мл, СРБ – выше 3,91 мг/л и VIIф – более 2,22 нг/мл рассматриваются как отличный разделительный критерий между больными ИБС и здоровыми лицами; концентрации NT-proBNP - более 23,87 пг/мл и ИЛ-6 – выше 1,72 пг/мл - как очень хороший, а ИЛ-8 более 4,89 пг/мл – как средний. Для величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л получены средние операционные характеристики (диаграмма 19, таблица 23).

Результаты ROC анализа различий содержания биомаркеров в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах у больных ИБС в сочетании с ГБ и здоровых лиц

	ЛВСЛ, ммоль/л	СРБ в супернатанте, мкг/л	ЛПв в супернатанте, нг/мл	ФВ в супернатанте, ЕД/мл	VII фактор свертываемости в супернат. нг/мл	NT- proBNP в суперната, пг/мл	дефензины в сыворотке, пг/мл	дефензины в супернатанте, пг/мл	СРБ в сыворот ке мг/л	VII фактор в сыворотке нг/мл	NT- proBNP в сыворотке пг/мл	ИЛ 6 в сыворотке пг/мл	ИЛ 8 в сыворотке пг/мл
TP (True Positives)/FP (False Positives)	39,00	22,00	18,00	0,00	1,00	24,00	30,00	29,00	6,00	7,00	9,00	6,00	12,00
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	28,00	8,00	12,00	12,00	29,00	4,00	0,00	1,00	23,00	23,00	35,00	43,00	38,00
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	0,58	0,73	0,60	0,00	0,03	0,86	1,00	0,97	0,21	0,23	0,20	0,12	0,24
AUC (площадь под графиком)	0,71	0,75	0,82	1,00	0,98	0,93	0,99	0,98	0,94	0,99	0,80	0,89	0,69
Максимум sp+se	1,51	1,42	1,60	2,00	1,89	1,81	1,92	1,97	1,72	1,97	1,51	1,78	1,37
Значение показателя в максимуме	0,15	25,33	28,23	0,07	0,64	21,00	1700,00	210000,00	3,91	2,22	23,87	1,72	4,89
Чувствительность в максимуме	0,58	0,70	0,80	1,00	0,93	0,96	1,00	0,97	0,72	1,00	0,82	0,78	0,52
Специфичность в максимуме	0,82	0,72	0,80	1,00	0,96	0,85	0,92	1,00	1,00	0,97	0,69	1,00	0,85

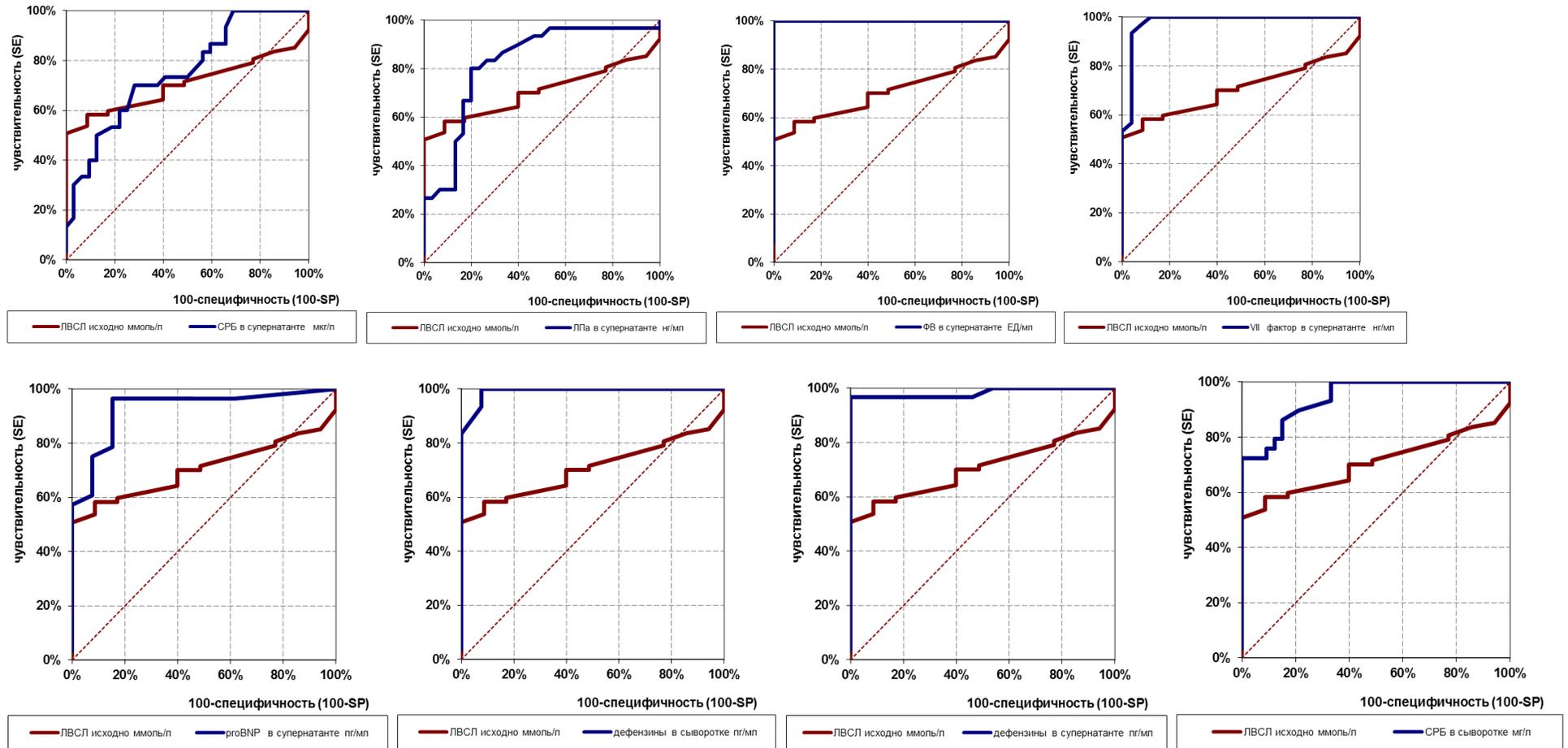


Диаграмма 19. ROC кривые, построенные по изучаемым показателям у больных ИБС в сочетании с ГБ

По полученным точкам разделения построена диаграмма Парето (диаграмма 20), анализ которой показал, что у больных ИБС в лейкоцитарных супернатантах наиболее часто отмечаются высокие концентрации дефензинов-альфа, фактора Виллебранда, VIIф и NT-proBNP.

Для оптимальной комплексной сравнительной оценки белково-пептидного паттерна в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах больных ИБС и здоровых лиц здоровых лиц выбраны: концентрация в супернатантах VIIф, NT-proBNP, дефензинов, в сыворотке крови – VIIф, СРБ и дефензинов, а также величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии: $y = -26,99 + 0,155 * x_1 + 0,277 * x_2 + 0,0192491 * x_3 + 0,000425268 * x_4 + 0,000021356 * x_5 + 1,61251 * x_6 + 3,62402 * x_7$, где x_1 - величина ЛВСЛ, x_2 - концентрация в супернатантах VIIф, x_3 - концентрация в супернатантах NT-proBNP, x_4 - концентрация в сыворотке крови дефензинов, x_5 - концентрация в супернатантах дефензинов, x_6 - сывороточная концентрация СРБ, x_7 - концентрация в сыворотке крови VIIф. Для оценки разделительной (от здоровых лиц) значимости данной математической модели, характеризующей белково-пептидный паттерн у больных ИБС, проведен ROC анализ (таблица 24, диаграмма 21). Данная модель по показателю AUC имеет отличные разделительные свойства.

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

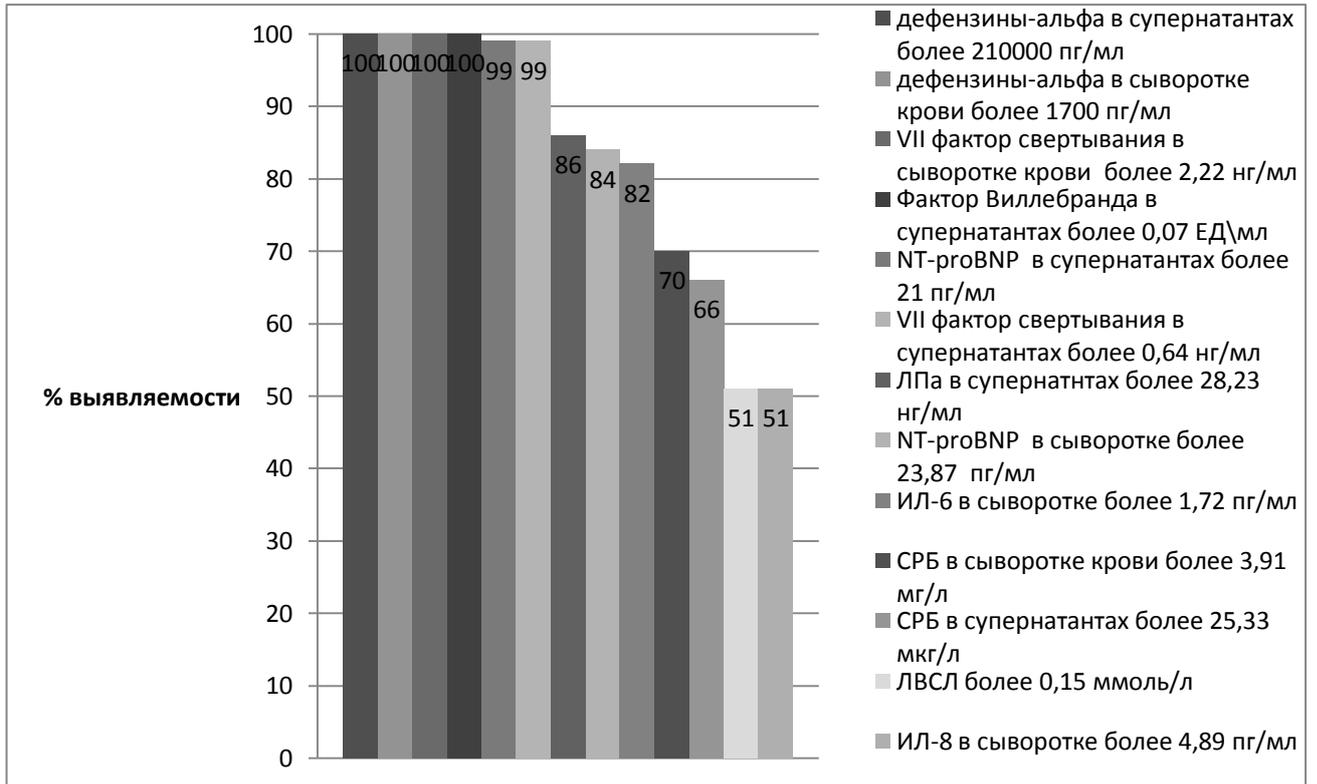


Диаграмма 20. Диаграмма Парето, построенная по частоте выявления высоких значений сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ИБС в сочетании с ГБ

Таблица 24

Результаты ROC анализа разделительной эффективности комплексной оценки белково-пептидного паттерна больных ИБС в сочетании с ГБ и здоровых лиц

<i>Показатель</i>	<i>Значение</i>
TP (True Positives)/FP (False Positives)	27
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	0
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	100,00%
AUC (площадь под графиком)	1,00
Максимум $sp+se$	2,00
Значение показателя в максимуме	0,01
Чувствительность в максимуме	1,00
Специфичность в максимуме	1,00

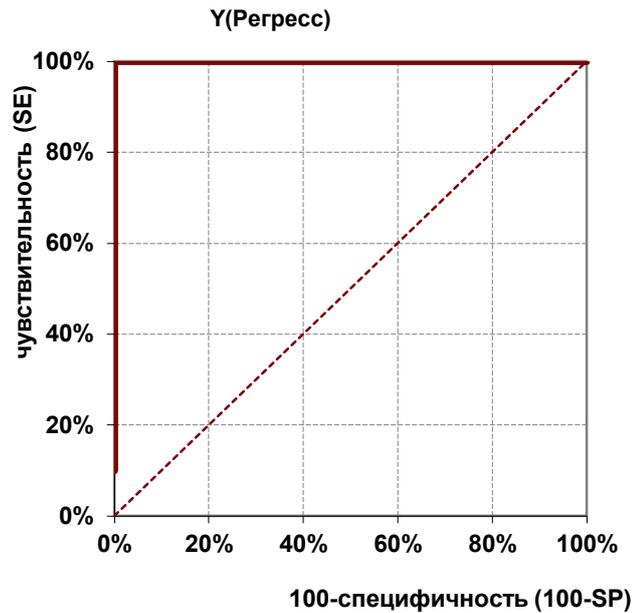


Диаграмма 21. ROC кривая у больных ИБС в сочетании с ГБ, построенная по значению γ

Анализ корреляций изучаемых показателей у больных ИБС показал, что величина ЛВСЛ имеет прямую умеренной силы связь с содержанием в сыворотке NT-proBNP, размерами левого желудочка, средним давлением в легочной артерии, фазой структурно-функциональных изменений сердца, креатинином крови; слабую прямую связь с возрастом больных, а также отрицательного характера взаимосвязь с ФВ ЛЖ (таблица 25). Обнаружена прямая, умеренно силы корреляция концентрации СРБ и дефензинов в лейкоцитарных супернатантах, а также дефензинов и NT-proBNP (таблица 27 и 29). Концентрация СРБ в лейкоцитарных супернатантах, количество лейкоцитов и процент моноцитов крови имели прямую умеренной силы связь (таблица 27). Было выявлено, что, чем выше содержание БСЖК в сыворотке крови, тем ниже концентрация в ней ЛПВП (умеренной силы связь) (таблица 26). Содержание дефензинов в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах было прямо связано с размерами левых отделов сердца и толщиной стенки левого желудочка (таблица 29). Умеренной силы связь между концентрацией VII фактора свертывания в супернатантах и его содержанием в сыворотке носила прямой характер ($R=0,61$, $p=0,0003$). Концентрация ЛПа в сыворотке крови и

лейкоцитарных супернатантах прямо коррелировала с размерами левого желудочка (прямая умеренной силы связь) (таблица 28). Был подтвержден известный факт прямой связи концентрации ФНО-альфа, ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови (таблица 30). Анализ корреляций показал, что, чем выше содержание ИЛ-6, тем больше размер левого предсердия и желудочка, тяжелее структурно-функциональное ремоделирование сердца и ниже ФВ ЛЖ (таблица 40). Факт взаимосвязи гиперцитокинемии и морфо-функциональных изменений сердечно-сосудистой системы известен в научной литературе [3].

Нами выявлено, что содержание ИЛ-6 и БСЖК в крови связаны прямой связью умеренной силы (таблица 26).

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 сывороточного 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.

Таблица 25

Корреляции ЛВСЛ у больных ИБС в сочетании с ГБ с клиническими, инструментальными и биохимическими показателями (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ЛВСЛ, ммоль/л	NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	0,32	0,0416
ЛВСЛ, ммоль/л	Возраст, лет	0,26	0,0352
ЛВСЛ, ммоль/л	Линейный размер ЛП, мм	0,81	0,0284
ЛВСЛ, ммоль/л	КСО ЛЖ, мл	0,40	0,0029
ЛВСЛ, ммоль/л	КДО ЛЖ, мл	0,34	0,0129
ЛВСЛ, ммоль/л	ФВ ЛЖ, %	-0,35	0,0081
ЛВСЛ, ммоль/л	Тип ремоделирования (1-3)	0,31	0,0174
ЛВСЛ, ммоль/л	СДЛА, мм рт ст	0,46	0,0151
ЛВСЛ, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	0,67	0,0473

Пояснения к таблице. Тип ремоделирования: 1- бессимптомная дисфункция, 2- адаптивное ремоделирование, 3- дезадаптивное ремоделирование.

Таблица 26

Корреляции содержания в сыворотке белка связывающего жирные кислоты с другими биохимическими показателями у больных ИБС в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
БСЖК в сыворотке пг/мл	ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	0,52	0,0033
БСЖК в сыворотке пг/мл	ЛПВП, ммоль/л	-0,57	0,0081

Таблица 27

Корреляции содержания СРБ в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с изучаемыми лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
СРБ в супернатанте, мкг/л	дефензины в супернатанте, пг/мл	0,37	0,0413
СРБ в супернатанте, мкг/л	ИЛ 6, пг/мл	0,46	0,0108
СРБ в супернатанте, мкг/л	Лейкоциты крови, 10 ⁹ в л.	0,50	0,0081
СРБ в супернатанте, мкг/л	Моноциты крови, %	0,57	0,0109
СРБ в супернатанте, мкг/л	Размер ЛП, мм	0,83	0,0194

Таблица 28

Корреляции содержания ЛПА в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с показателями УЗИ сердца у больных ИБС в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ЛПА в сыворотке, нг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,47	0,0404
ЛПА в супернатанте, нг/мл	КДО ЛЖ, мл	0,43	0,0225

Таблица 29

Корреляции содержания дефенинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с инструментальными и лабораторными показателями больных ИБС в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
дефензины в сыворотке, пг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,58	0,0013
дефензины в сыворотке, пг/мл	Тип ремоделирования (1-3)	0,43	0,0176
дефензины в сыворотке, пг/мл	КДО ЛЖ, мл	0,57	0,0111
дефензины в супернатанте, пг/мл	ИЛ 6, пг/мл	0,47	0,0085
дефензины в супернатанте, пг/мл	Размер ЛП, мм	0,80	0,0311
дефензины в супернатанте, пг/мл	ММЛЖ, г.	0,81	0,0076
дефензины в супернатанте, пг/мл	Размер ЛП, мм	0,78	0,0374
дефензины в супернатанте, пг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,48	0,0361
дефензины в супернатанте, пг/мл	NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	0,40	0,0343

Таблица 30

Корреляции концентрации цитокинов в сыворотке крови с инструментальными и лабораторными показателями у больных ИБС в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	ФНО в сыворотке, пг/мл	0,32	0,0248
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	Лейкоциты крови, 10 ⁹ в л	0,36	0,0201
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	Размер ЛП, мм	0,81	0,0279
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,39	0,0100
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	ФВ ЛЖ, %	-0,44	0,0023
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	ФНО в сыворотке, пг/мл	0,32	0,0253
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	КДР ЛЖ, мм	0,40	0,0064
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	Тип ремоделирования (1-3)	0,32	0,0310

Резюме

Таким образом, у больных ИБС (общая группа) выявлено, что в сравнении со здоровыми лицами в сыворотке значимо выше концентрация СРБ, ЛПА, дефензинов, VIIф, NT-proBNP, ФВ, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-альфа, а в супернатантах лейкоцитарных культур - содержание дефензинов-альфа, СРБ, ЛПА, VIIф, ФВ и NT-proBNP. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация в сыворотке дефензинов-альфа, СРБ и VIIф, в супернатантах – дефензинов-альфа, NT-proBNP, VIIф, а также величина ЛВСЛ) для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн, характерный для больных ИБС (AUC-1). Для показателей, включенных в построенную модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение концентрации NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах на 1% приводит к росту значения γ на 0,04%, дефензинов – на 0,45% и VIIф - на 0,01%. Показано, что прирост концентрации в сыворотке крови СРБ на 1% приводит к увеличению значения γ на 0,12%; дефензинов-альфа – на 0,04% и VIIф - на 0,34%, а величины ЛВСЛ – на 0,01%.

У больных ИБС выявлена прямая взаимосвязь величины ЛВСЛ с сурогатными маркерами ХСН (размеры ЛЖ, сывороточное содержание NT-proBNP, тип ремоделирования сердца).

В этой группе больных содержание дефензинов и ЛПА в сыворотке и супернатантах прямо коррелировало с размерами левого желудочка, а сывороточная концентрация ИЛ-6 была прямо взаимосвязана с размерами левого предсердия и обратно - с фракцией выброса левого желудочка.

Показана, что связь показателей липидного спектра с изученными маркерами у пациентов с ИБС имеет более слабый характер, чем в группе больных ГБ, что объясняется более частым применением статинов в группе больных коронарным атеросклерозом.

4.2. Результаты исследования в группе больных ишемической болезнью сердца со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с гипертонической болезнью

Результаты изучения состояния гемограммы, липидного спектра, показателей гемостаза приведены в таблицах 31-33. Данные результаты схожи с таковыми в общей группе больных ИБС. Для больных этой подгруппы характерен умеренный нейтрофильный лейкоцитоз (таблица 31), угнетение фибринолиза (таблица 33). 85% пациентов этой подгруппы принимали статины, однако целевых значений показателей липидного спектра достигнуто не было (таблица 32).

Таблица 31

Гемограмма у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ и у здоровых лиц

	Группа больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ - Median (percentel 10/90) (n-47)	Группа сравнения (здоровые лица) - Median (percentel 10/90)(n-33)	P
Эритроциты, 10^{12} в л	4,39 (3,27;5,18)	4,97 (4,38;5,67)	0,7
Гемоглобин, г/л	127,49 (121,00; 158,00)	142,13 (126,00; 158,00)	0,9
Лейкоциты, 10^9 в л.	7,70 (5,60; 11,60)	6,13 (4,93; 8,30)	0,9
Эозинофилы, %	2,00 (0,00;8,00)	3,1 (0,00;5,00)	0,98
Эозинофилы, 10^9 в л	0,21 (0,04;0,49)	0,78 (0,02;1,51)	0,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	63,50 (50,00;78,00)	64,78 (51,00;73,00)	0,7
Сегментоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	4,94 (3,23;7,07)	3,44 (2,37;6,11)	0,05
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,00 (1,00;6,00)	2,24 (0,00;5,00)	1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	0,22 (0,05;0,48)	0,09 (0,00;0,24)	0,9
Лимфоциты, %	24,00 (12,00;41,00)	26,89 (18,00;34,00)	0,9
Лимфоциты, 10^9 в л.	1,92 (0,86;3,45)	1,51 (0,97;2,99)	0,8
Моноциты, %	5,00 (2,00;9,00)	5,68 (3,00;8,00)	0,8
Моноциты, 10^9 в л.	0,38 (0,13;0,84)	0,33(0,15;0,71)	1,0
СОЭ, мм/час	10,44(5,00;24,00)	7,54 (3,00;17,00)	0,8
Тромбоциты, 10^9 в л.	276,00 (125,0;460,0)	287,25 (226,0;351,0)	0,8

Таблица 32

Липидограмма у больных ИБС стабильного течения в сочетании с ГБ (n-47)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Холестерин, ммоль/л	4,92	3,50	6,30	1,22
ЛПВП, ммоль/л	1,31	0,82	2,50	0,57
ЛПНП, ммоль/л	2,90	2,05	3,86	0,67
ТГ, ммоль/л	1,74	1,20	2,40	0,47
ЛПОНП, ммоль/л	1,28	0,49	1,29	1,81
ИА	3,61	2,47	4,47	0,77

Таблица 33

Коагулограмма у больных ИБС стабильного течения в сочетании с ГБ (n-47)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
АПТВ, сек	28,48	25,00	31,00	2,56
ПТВ, сек	18,65	15,00	28,00	5,06
АДФ, сек	12,00	9,00	15,00	2,11
ХЗФ, мин	48,21	24,00	60,00	15,51

Результаты УЗИ сердца приводятся в таблице 34.

Таблица 34

Результаты ультразвукового исследования сердца у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (n-47)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ЛП, мм	39,78	32,00	47,00	6,44
Объем ЛП, мл	51,76	37,00	68,00	11,45
КСО, мл	47,33	34,00	62,00	13,78
КДО, мл	124,69	88,00	180,00	45,30
КСР, см	3,80	3,10	5,20	0,83
КДР, см	5,07	4,40	6,40	0,78
ИКДР, см/м ²	2,59	2,26	2,94	0,27
ПЖ, см	3,23	2,10	3,25	3,87
ФВ %	53,36	44,00	63,00	10,26
МЖП, мм	11,48	9,00	14,00	2,27
ЗСЛЖ, мм	11,20	9,00	13,00	1,69
Средняя толщина стенок ЛЖ, см	1,13	0,90	1,30	0,19
ИММЛЖ, г/м ²	134,76	99,57	182,69	33,97
ММ ЛЖ, г	251,33	145,67	378,17	83,17
ПП, мм	39,23	32,00	49,00	7,04
НПВ, мм	15,27	13,00	18,00	2,27
ВТЛЖ, мм	19,07	16,00	22,00	2,37
СДЛА, мм рт. ст.	23,17	10,00	37,00	13,65
ИОТС	0,44	0,32	0,58	0,11
УО, ЛЖ, мл	62,94	49,00	82,00	17,90

Анализ средних значений параметров УЗИ сердца позволяет констатировать наличие у пациентов данной группы признаков дилатации левых отделов сердца (преимущественно левого предсердия), незначительного снижения систолической функции, гипертрофии левого желудочка, а также умеренного повышения давления в системе легочной артерии (см. таблицу 34).

Разделение пациентов по структурно-функциональным типам повреждения сердца, представленное на диаграмме 22, показало преобладание БДМ. 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 ($R=0,33$, $p=0,04$), 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 (таблица 35). Взаимосвязи тяжести поражения коронарного русла с ФК ХСН и ФК стенокардии напряжения не отмечено.

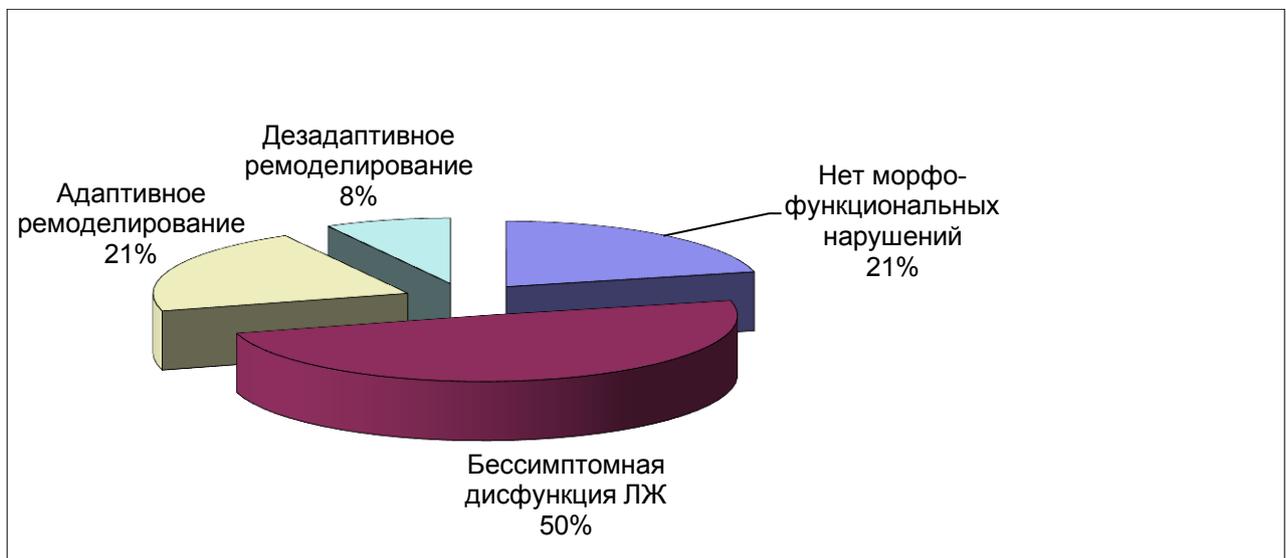


Диаграмма 22. Структура типов морфо-функциональных изменений миокарда у больных ИБС в сочетании с ГБ

Результаты специального исследования у больных ИБС стабильного течения приводятся в таблице 36. Выявлено, что средние значения содержания в сыворотке СРБ, ЛПа, NT-proBNP, дефензинов, ИЛ-6 и ФНО-альфа были выше нормы.

Проведен статистический анализ различий результатов данной группы пациентов от здоровых лиц (таблица 36).

Таблица 35

Состояние коронарного кровообращения в группе больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (n=24)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ПМЖА прокс., %	77,78	40,00	100,00	22,24
ПМЖА сред., %	72,69	40,00	100,00	24,11
ПМЖА дист., %	73,60	50,00	98,00	17,10
ОА сред., %	70,36	40,00	90,00	21,27
ОА дист., %	57,00	50,00	61,00	6,08
ОА прокс., %	55,00	30,00	80,00	19,49
ПКА прокс. %	59,75	30,00	100,00	29,73
ПКА сред. %	76,00	40,00	100,00	24,34
ПКА дист., %	67,50	30,00	99,00	33,01
ВТК 1., %	59,17	30,00	100,00	24,17
ВТК 2., %	65,00	30,00	100,00	28,87
ЛКА., %	50,00	30,00	70,00	28,28
1 ДВ, %	77,80	45,00	99,00	21,72
ЗМЖА, %	79,67	60,00	99,00	19,50
количество шунтов	3,74	2,00	5,00	1,29

Таблица 36

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

Как видно из данных таблицы 36, содержание изучаемых белков в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах было значимо выше у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения. Величина ЛВСЛ у больных данной подгруппы также значимо превышала таковую здоровых лиц группы сравнения.

Путем построения ROC кривых проведена оценка разделительной эффективности выявленных различий у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и здоровых лиц (таблица 37, диаграмма 23).

Анализ значения AUC показал, что концентрация в лейкоцитарных супернатантах дефензинов выше 210000 пг/мл, NT-proBNP - более 21 пг/мл, ФВ - свыше 0,07 ЕД/мл, VIIф - более 0,64 нг/мл имеют отличную разделительную (от здоровых лиц) эффективность у больных ИБС; СРБ более 25,33 мкг/л – очень хорошую, а ЛПа свыше 28,23 нг/мл - хорошую. Содержание в сыворотке крови дефензинов-альфа более 1448 пг/мл, СРБ – выше 3,99 мг/л и VIIф – более 2,22 нг/мл рассматриваются как отличный разделительный критерий между больными ИБС и здоровыми лицами, концентрации NT-proBNP более 23,87 пг/мл и ИЛ-6 – 2,19 пг/мл - как очень хороший, а ИЛ-8 более 4,89 пг/мл – как хороший. Для величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л получены средние операционные характеристики (диаграмма 24, см. таблицу 37).

По полученным точкам разделения в группе больных ИБС стабильного течения построена диаграмма Парето (диаграмма 24), выявившая, наибольшую частоту обнаружения повышенного содержания в супернатантах дефензинов, ФВ, СРБ, VIIф и NT-proBNP.

Результаты ROC анализа различий содержания биомаркеров в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ и здоровых лиц

	ЛВСЛ, ммоль/л	СРБ в супернатанте, мкг/л	ЛПв в супернатанте, нг/мл	ФВ в супернатанте, ЕД/мл	ВПф свертываемости в супернатанте нг/мл	NT-proBNP в супернатанте., пг/мл	дефензины в сыворотке, пг/мл	дефензины в супернатанте, пг/мл	СРБ в сыворотке, мг/л	ВПф в сыворотке , нг/мл	NT- proBNP в сыворотк е пг/мл	ИЛ 6 в, пг/мл	ИЛ 8,е пг/мл
TP (True Positives)/FP (False Positives)	29,00	16,00	10,00	0,00	1,00	18,00	20,00	20,00	14,00	6,00	8,00	5,00	12,00
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	28,00	4,00	10,00	12,00	19,00	0,00	0,00	0,00	6,00	14,00	26,00	34,00	28,00
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	0,51	0,80	0,50	0,00	0,05	1,00	1,00	1,00	0,70	0,30	0,24	0,13	0,30
AUC (площадь под графиком)	0,65	0,80	0,79	1,00	0,98	0,97	0,99	1,00	0,94	0,99	0,82	0,87	0,74
Максимум sp+se	1,42	1,47	1,50	2,00	1,91	1,85	1,92	2,00	1,72	1,97	1,55	1,74	1,45
Значение показателя в максимуме	0,15	25,33	28,23	0,07	0,64	21,00	1448,00	210000,00	3,99	2,22	23,87	2,19	4,89
Чувствительность в максимуме	0,51	0,75	0,70	1,00	0,95	1,00	1,00	1,00	0,70	1,00	0,85	0,74	0,60
Специфичность в максимуме	0,82	0,72	0,80	1,00	0,96	0,85	0,92	1,00	1,00	0,97	0,69	1,00	0,85

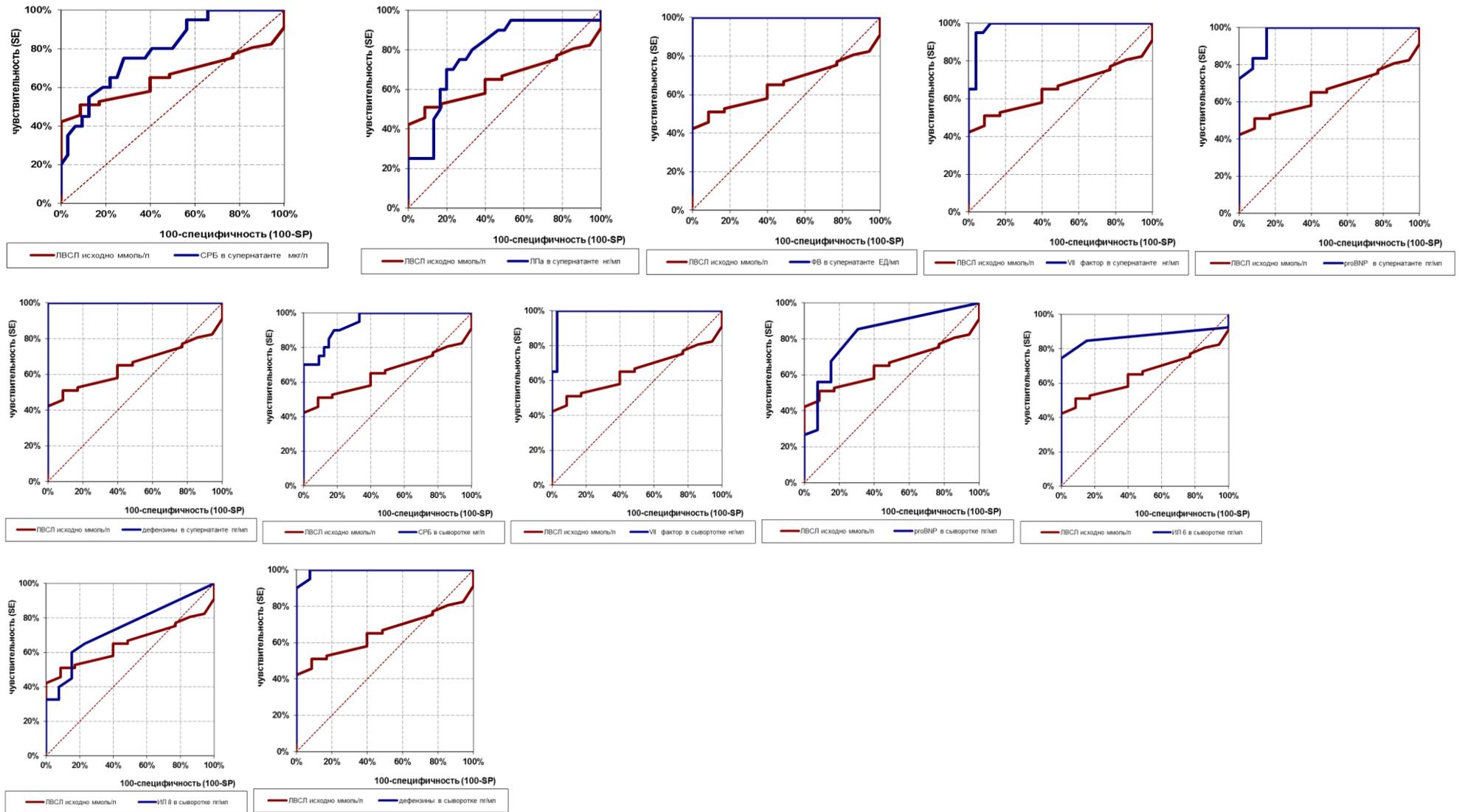


Диаграмма 23. ROC кривые, построенные по изучаемым показателям больных ИБС стабильного течения в сочетании с ГБ, для оценки статистической значимости различий от здоровых лиц

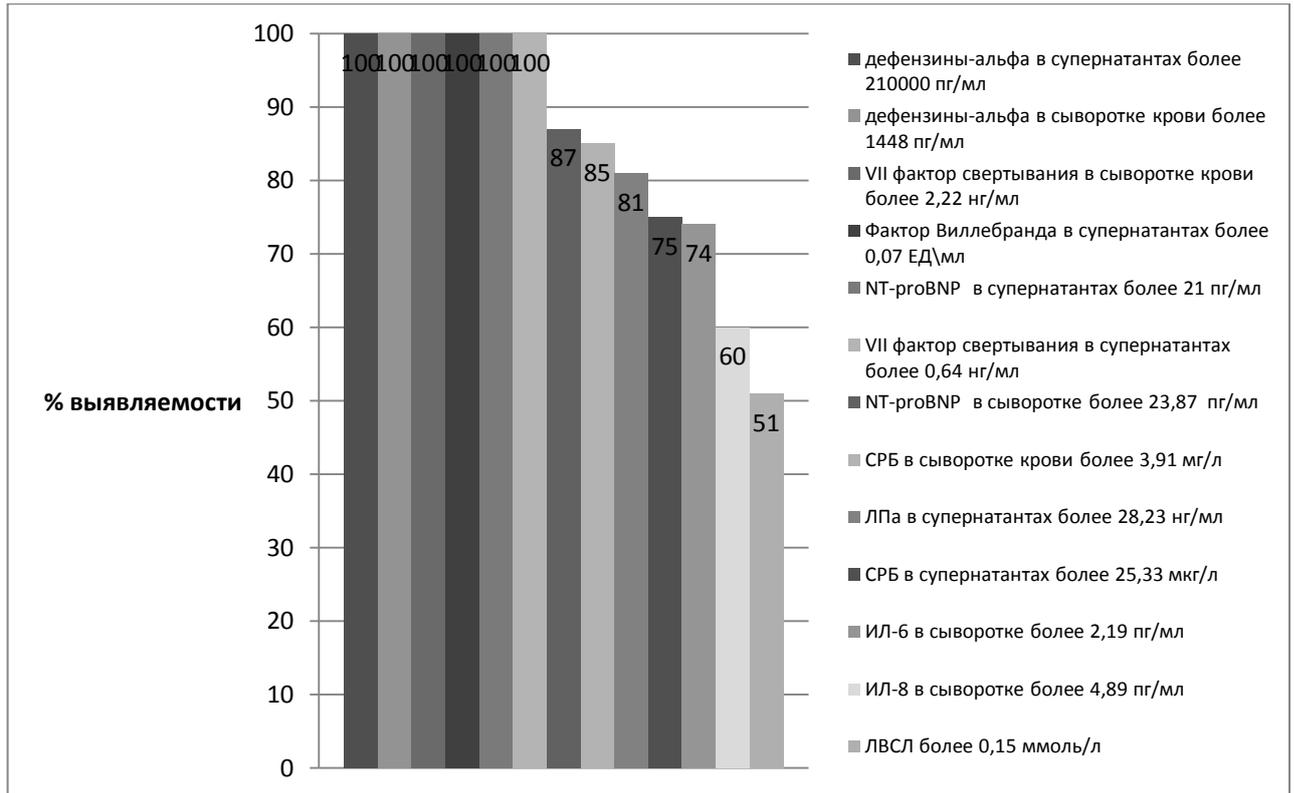


Диаграмма 24. Диаграмма Парето, построенная по частоте выявления высоких значений изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов в группе больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ

Для комплексной оценки паттерна белково-пептидных факторов, содержащихся в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах выбраны: концентрация в супернатантах NT-proBNP, VIIф, дефензинов, в сыворотке – дефензинов и VIIф. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии: $y = -29,518 + 2,8704 * x_1 + 0,0400811 * x_2 + 0,000769525 * x_3 +$

$0,000034573 * x_4 + 2,37396 * x_5$, где x_1 - концентрация VIIф в супернатантах, x_2 - концентрация NT-proBNP в супернатантах, x_3 - концентрация дефензинов-альфа в сыворотке крови, x_4 - концентрация дефензинов-альфа в супернатантах, x_5 - концентрация VIIф. в супернатантах

Путем ROC анализа произведена оценка разделительной эффективности комплексного подхода к оценке биомаркеров (таблица 38, диаграмма 25).

Результаты ROC анализа разделительной значимости комплексного подхода в оценке различий содержания белково-пептидных факторов в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ и здоровых лиц

Показатель	Значение
TP (True Positives)/FP (False Positives)	18
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	0
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	100,00%
AUC (площадь под графиком)	1,00
Максимум sp+se	2,00
Значение показателя в максимуме	0,01
Чувствительность в максимуме	1,00
Специфичность в максимуме	1,00

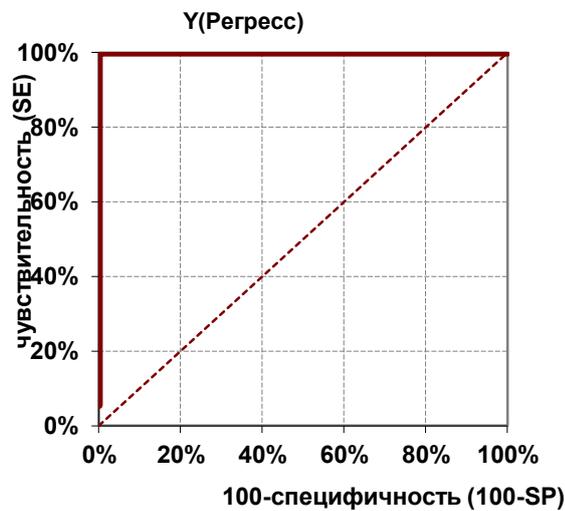


Диаграмма 25. ROC кривая, построенная по значению γ у больных ИБС стабильного течения в сочетании с ГБ

Данный комплексный подход по показателю AUC имеет отличные прогностические свойства.

Для показателей, включенных в данную модель, определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение концентрации NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах на 1% приводит к росту значения γ на 0,13%, дефензинов – на 0,63% и VIIф - на 0,05%. Показано, что прирост концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови на 1% приводит к увеличению значения γ на 0,06%, и VIIф - на 0,13%.

Проведена оценка результатов экспериментального исследования в выделенной подгруппе пациентов со стабильной стенокардией напряжения III

функционального класса. 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 NT-proBNP в лизатах 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) ($p = 0.034$).

Эксперимент продемонстрировал, что в ходе культивирования в условиях тесного межклеточного контакта концентрация NT-proBNP достоверно возросла. Данный факт косвенно свидетельствует в пользу возможности продукции NT-proBNP в культурах лейкоцитов, а также в тканях больных ИБС, осложненной ХСН. Отсутствие достоверной динамики содержания СРБ объясняется, по всей видимости, тем, что в экспериментальную группу были отбраны пациенты со стабильной формой ИБС, у которых значение в патогенезе этого белка заболевания ниже, чем у больных нестабильными формами этого заболевания. Можно предположить, что исходное содержание СРБ в нейтрофилах объясняется его синтезом на предшествующих этапах созревания нейтрофилов или моноцитов в костном мозге (конституциональный фактор). Возникает предположение о том, что увеличение продукции какого-либо белка (пептида) в клеточной культуре отражает особенности патогенеза и клинической картины определенного заболевания. В конкретном случае материал исследования составили больные с прогрессирующим течением ХСН, что послужило причиной их госпитализации в кардиологический стационар. При этом установлено увеличение активности нейтрофилов в отношении продукции NT-proBNP, ассоциированного с этим патологическим состоянием.

Проведен статистический анализ значимости различий показателей специальной программы обследования у больных ИБС стабильного течения и у пациентов с ГБ без клинических и ультразвуковых проявлений атеросклероза (таблица 39). Показано, что величина ЛВСЛ, концентрация дефензинов-альфа в

супернатантах, NT-proBNP, ИЛ-6 и ФНО-альфа в сыворотке достоверно выше у больных ИБС стабильного течения. Определены точки разделения по изучаемым показателям между больными ИБС со стабильной стенокардией напряжения и ГБ путем построения ROC кривых (таблица 40, диаграмма 26). Концентрации дефензинов-альфа в супернатанте более 300214 пг/мл, ИЛ-6 в сыворотке крови более 2,58 пг/мл и величина ЛВСЛ – выше 0,15 ммоль/л являются хорошими разделительными критериями между больными ИБС стабильного течения и ГБ, а содержание ФНО-альфа в сыворотке крови свыше 12,23 пг/мл - средним по эффективности показателем (таблица 40 и диаграмма 26).

Таблица 39

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

Показатель	Группа больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ Median (percentel 10/90) (n-47)	Группа больных ГБ Median (percentel 10/90) (n-25)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,16 (0,09/0,25)	0,12(0,07/0,16)	0,001
БСЖК в сыворотке, пг/мл	600,53(328/820,75)	718,14(360,5/1107,5)	0,78
БСЖК в супернатанте, пг/мл	1,49(0,09/0,25)	16,63(0/109,1)	0,82
СРБ в сыворотке, мг/л	6,99 (1,88/10,29)	4,12 (1,66/15,25)	0,74
СРБ в супернатанте, мкг/л	49,57 (16,25/106)	55,9 (18,3/130)	0,65
ЛПА в сыворотке, нг/мл	42,65 (26,9/40,5)	39,89 (22,05/68,75)	0,23
ЛПА в супернатанте, нг/мл	37,73 (23,55/55,25)	52,19(32,5/84,00)	0,51
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	5,59 (3,34/8,8)	4,93(2,53/7,28)	0,78
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	2,38 (0,72/4,51)	2,37(0,78/4,74)	0,85
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	499,89 (29/2154)	142,33 (10,00/151,50)	0,001
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	157,12(23,73/257,64)	138,14 (47,46/277,98)	0,19
Дефензины в сыворотке, пг/мл	4389,94(2096,6/7932,0)	6577,54 (3390,80/11296,00)	0,91
Дефензины в супернатанте, пг/мл	656635(406000/921150)	518428,6 (109300,00/863000,00)	0,02
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	12,67 (1,3/52,64)	2,48 (0,11/7,30)	0,001
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	48,13 (0/154,25)	8,52 (0/27,3)	0,09
ФНО-альфа в сыворотке, пг/мл	29,67(1,45/66,05)	6,19 (1,8/12,8)	0,01

Результаты ROC анализа различий содержания биомаркеров в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ и ГБ

Показатель	ЛВСЛ исходно ммоль/л	дефензины в супернатанте пг/мл	ИЛ 6 в сыворотке пг/мл	ФНО в сыворотке
TP (True Positives)/FP (False Positives)	39,00	27,00	6,00	8,00
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	28,00	4,00	43,00	42,00
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	0,58	0,87	0,12	0,16
AUC (площадь под графиком)	0,71	0,70	0,76	0,68
Максимум sp+se	1,46	1,57	1,45	1,35
Значение показателя в максимуме	0,15	300214,00	2,58	12,23
Чувствительность в максимуме	0,49	0,87	0,71	0,44
Специфичность в максимуме	0,97	0,70	0,73	0,91

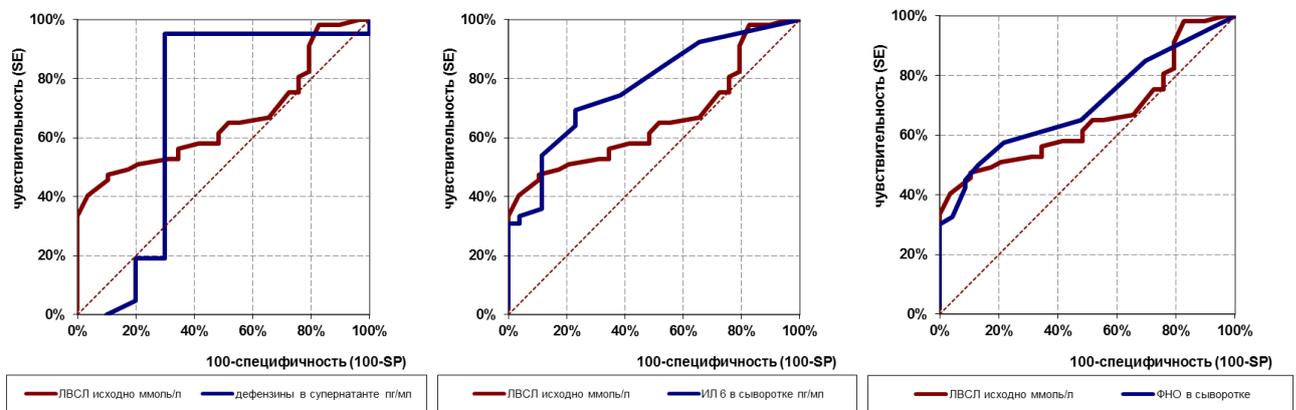


Диаграмма 26. ROC кривые, построенные по значениям величины ЛВСЛ, концентрации дефензинов в супернатанте, ИЛ-6 и ФНО-альфа в сыворотке крови для оценки различий между больными ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ и ГБ

Для комплексной оценки различий белково-пептидного паттерна больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и ГБ выбраны значения концентрации дефензинов в супернатантах, ИЛ-6 и ФНО-альфа в сыворотке крови и 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. 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

концентрации дефенинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах на 1% приводит к росту значения γ на 0,69%, величины ЛВСЛ – на 0,28%. Показано, что прирост концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови на 1% приводит к увеличению значения γ на 0,01%, и ФНО-альфа - на 0,03%.

Проведен анализ корреляций изучаемых лабораторных, инструментальных и клинических показателей (таблицы 41-48).

Анализ зависимости величины ЛВСЛ от других показателей выявил, что имеется прямая умеренной силы связь с содержанием дефенинов и NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах (таблица 41). Показано, что, чем выше значение ЛВСЛ, тем больше процент сужения коронарных артерий по данным ангиографии (сильная связь) и выше ФК ХСН (умеренной силы связь) (таблица 41).

Установлено, что концентрации VIIф, NT-proBNP, СРБ, БСЖК в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах связаны прямой умеренной силы связью (таблицы 42-45).

Содержание в супернатантах БСЖК и дефенинов-альфа, NT-proBNP и дефенинов-альфа, дефенинов-альфа и СРБ имеет прямую умеренной силы связь (таблицы 42, 46-47).

Количество лейкоцитов и концентрация NT-proBNP в сыворотке демонстрирует прямую зависимость этих показателей (умеренной силы связь) (таблица 46).

Выявлено, что концентрация дефенинов-альфа в сыворотке крови коррелирует с тяжестью фазы ремоделирования сердца (прямая сильная связь) (таблица 47).

Показано, что содержание дефенинов в лейкоцитарных супернатантах, размеры ЛЖ и предсердия, масса миокарда ЛЖ имеют сильную прямую связь (таблица 47).

Определена прямая умеренной силы связь между концентрацией в сыворотке крови СРБ и ИЛ-6 (таблица 43). Концентрация СРБ в супернатанте и количество моноцитов крови также имеют сильную прямую связь друг с другом

(таблицу 43). Содержание СРБ в лейкоцитарных супернатантах прямо коррелирует с массой миокарда ЛЖ (таблица 43).

Выявлено, что концентрация ЛПа в сыворотке имеет прямую связь с размерами ЛЖ и обратную - с ФВ ЛЖ (таблица 44). Взаимозависимость между концентрацией ЛПа в супернатантах и дефензинов в сыворотке носит прямой характер (умеренной силы связь) (таблица 44).

Подтверждены известные данные, что концентрация ИЛ-6 и ФНО-альфа, а также ИЛ-8 и ФНО-альфа прямо коррелируют друг с другом (умеренной силы связь) (таблица 48). Обнаружено, что концентрация ФНО-альфа сыворотки и тяжесть стеноза коронарной артерии имеют прямую сильную взаимозависимость (таблица 48).

Из всех изученных сывороточных и лейкоцитарных факторов только сывороточное содержание VIIф коррелировало с концентрацией ТГ ($R=0,63, p=0,034$). С другими «традиционными» липидными факторами взаимосвязей не выявлено, что объясняется частым применением статинов у пациентов этой подгруппы.

Таблица 41

Корреляции величины ЛВСЛ с клиническими, лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ЛВСЛ, ммоль/л	NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	0,54	0,0209
ЛВСЛ, ммоль/л	дефензины в супернатанте, пг/мл	0,47	0,0344
ЛВСЛ, ммоль/л	Процент сужения коронарной артерии (по данным коронарографии), %	0,70	0,0374
ЛВСЛ, ммоль/л	Количество клинически значимых стенозов	0,40	0,0456
ЛВСЛ, ммоль/л	ФК ХСН	0,40	0,02304

Таблица 42

Корреляции содержания БСЖК в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах с другими лабораторными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
БСЖК в сыворотке, пг/мл	СРБ в сыворотке, мг/л	0,45	0,0481
БСЖК в сыворотке, пг/мл	ИЛ 6, пг/мл	0,48	0,0340
БСЖК в сыворотке, пг/мл	ЛПВП, ммоль/л	-0,57	0,0081
БСЖК в супернатанте, пг/мл	БСЖК в сыворотке, пг/мл	0,45	0,0448
БСЖК в супернатанте, пг/мл	дефензины в супернатанте, пг/мл	0,47	0,0353

Таблица 43

Корреляции содержания СРБ в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с другими лабораторными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
СРБ в сыворотке, мг/л	СРБ в супернатанте, мкг/л	0,70	0,0007
СРБ в сыворотке, мг/л	ИЛ 6, пг/мл	0,62	0,0038
СРБ в супернатанте, мкг/л	моноциты, %	0,57	0,0109

Таблица 44

Корреляции содержания ЛПА в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с другими лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ЛП (а) в сыворотке, нг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,47	0,0404
ЛП (а) в сыворотке, нг/мл	ФВ ЛЖ, %	-0,50	0,0280
ЛПА в супернатанте, нг/мл	дефензины в сыворотке, пг/мл	0,52	0,0181
ЛПА в супернатанте, нг/мл	КДО ЛЖ, мл	0,51	0,0269
ЛПА в супернатанте, нг/мл	ЗСЛЖ, мм	0,49	0,0378

Таблица 45

Корреляции содержания VII фактора свертываемости в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с другими лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
VII фактор в сыворотке, нг/мл	VII фактор в супернатанте, нг/мл	0,68	0,0010
VII фактор в сыворотке, нг/мл	Количество клинически значимых стенозов коронарных артерий	0,45	0,0485
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	-0,64	0,0043
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	количество клинически значимых стенозов коронарных артерий	0,45	0,0489

Таблица 46

Корреляции содержания NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с другими лабораторными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	0,69	0,0061
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	дефензины в супернатанте, пг/мл	0,40	0,0343

Таблица 47

Корреляции содержания дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с другими лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
дефензины в сыворотке, пг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,58	0,0013
дефензины в сыворотке, пг/мл	Тип ремоделирования: 1-3	0,43	0,0176
дефензины в сыворотке, пг/мл	КДО ЛЖ, мл	0,57	0,0111
дефензины в супернатанте, пг/мл	СРБ в супернатанте, мкг/л	0,37	0,0413
дефензины в супернатанте, пг/мл	NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	0,40	0,0343
дефензины в супернатанте, пг/мл	ИЛ 6, пг/мл	0,47	0,0085
дефензины в супернатанте, пг/мл	Размер ЛП, мм	0,80	0,0311
дефензины в супернатанте, пг/мл	ММЛЖ, г	0,81	0,0076
дефензины в супернатанте, пг/мл	Размер ПП, мм	0,78	0,0374
дефензины в супернатанте, пг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,48	0,0361

Таблица 48

Корреляции содержания цитокинов в сыворотке крови с другими лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	дефензины в супернатанте, пг/мл	0,54	0,0137
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	ФНО альфа в сыворотке, пг/мл	0,48	0,0303
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	КСО ЛЖ, мл	0,57	0,0114
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	ФВ ЛЖ, %	-0,51	0,0253
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	ФНО в сыворотке, пг/мл	0,66	0,0016
ФНО в сыворотке, пг/мл	Стеноз коронарных артерий, %	0,71	0,0322

Резюме

Таким образом, показано, что у больных ИБС стабильного течения в сочетании с ГБ в сыворотке значимо выше концентрация СРБ, ЛПА, дефензинов, VII фактора свертывания, NT-proBNP, фактора Виллебранда, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-альфа, а в супернатантах лейкоцитарных культур содержание дефензинов, СРБ, ЛПА, VII фактора свертывания, ФВ и NT-proBNP. Комплексный подход к оценке белково-пептидного паттерна с определением содержания дефензинов-альфа в сыворотке; СРБ, ЛПА, VII фактора свертывания, NT-proBNP - в супернатантах, а также величины ЛВСЛ в 100% случаев разделяет больных ИБС стабильного течения и здоровых лиц.

В сравнении с больными ГБ у больных ИБС в сыворотке крови определялись более высокие значения концентрации ИЛ-6 и ФНО-альфа, в супернатантах – дефензинов, а также величины ЛВСЛ. Наилучшую

статистическую эффективность в разграничении ИБС и ГБ показали концентрация дефензинов-альфа в супернатантах и величина ЛВСЛ.

У больных ИБС стабильного течения величина ЛВСЛ прямо связана с содержанием дефензинов-альфа и NT-proBNP в супернатантах. Обнаружена прямая зависимость содержания дефензинов в супернатантах с концентрацией в них СРБ, NT-proBNP и БСЖК. Установлено, что содержание в сыворотке и супернатантах VIIф, NT-proBNP, СРБ и БСЖК прямо взаимосвязано. У пациентов этой группы показано, что величина ЛВСЛ отражает тяжесть атеросклеротических изменений и клинических проявлений ХСН.

Показано, что величина ЛВСЛ прямо взаимосвязана с функциональным классом ХСН (по данным теста 6 минутной ходьбы с on-line мониторингом ЧСС), а также процентом сужения коронарных артерий (по данным ангиографии).

Эксперимент с культурами лейкоцитов больных этой подгруппы продемонстрировал, что в ходе культивирования в условиях тесного межклеточного контакта концентрация NT-proBNP достоверно возросла. Данный факт косвенно свидетельствует в пользу возможной продукции NT-proBNP в культурах лейкоцитов больных ИБС, осложненной ХСН.

4.3. Результаты исследования в группе больных ишемической болезнью сердца с нестабильной стенокардией в сочетании с гипертонической болезнью

Результаты исследования гемограммы показали наличие у пациентов этой группы нейтрофильного лейкоцитоза (ориентируясь на сравнительный анализ средних значений с нормативным диапазоном), однако достоверных различий с группой практически здоровых лиц не получено из-за большой дисперсии признаков (таблица 49).

Таблица 49

Гемограмма у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ и у здоровых лиц			
	Группа больных ИБС с нестабильной стенокардией - Median (persentel 10/90) (n-19)	Группа сравнения - Median (persentel 10/90) (n-33)	P
Эритроциты, 10^{12} в л	4,65 (3,78;5,45)	4,97 (4,38;5,67)	0,6
Гемоглобин, г/л	131,61 (129,00; 156,00)	142,13 (126,00; 158,00)	0,9
Лейкоциты, 10^9 в л.	7,62 (5,12; 10,63)	6,13 (4,93; 8,30)	0,9
Эозинофилы, %	3,00 (0,00;7,00)	3,1 (0,00;5,00)	0,7
Эозинофилы, 10^9 в л	0,26 (0,05;0,51)	0,78 (0,02;1,51)	0,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	64,79 (53,00;76,00)	64,78 (51,00;73,00)	0,7
Сегментоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	4,32 (3,53;6,98)	3,44 (2,37;6,11)	0,07
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,00 (1,00;6,00)	2,24 (0,00;5,00)	1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	0,21 (0,03;0,43)	0,09 (0,00;0,24)	0,9
Лимфоциты, %	24,00 (15,00;38,00)	26,89 (18,00;34,00)	0,9
Лимфоциты, 10^9 в л.	1,84 (0,73;3,67)	1,51 (0,97;2,99)	0,8
Моноциты, %	5,00 (3,00;9,00)	5,68 (3,00;8,00)	0,8
Моноциты, 10^9 в л.	0,34 (0,18;0,79)	0,33(0,15;0,71)	1,0
СОЭ, мм/час	11,97(6,00;25,00)	7,54 (3,00;17,00)	0,8
Тромбоциты, 10^9 в л.	289,00 (208,0;389,0)	287,25 (226,0;351,0)	0,8

Анализ результатов исследования липидного спектра выявил, что пациенты этой группы имели показатели липидограммы сходные с таковыми общей группы больных ИБС и отличались в лучшую сторону от группы пациентов с ГБ (таблица 50).

Липидограмма у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ (n-19)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Холестерин, ммоль/л	4,94	4,20	6,50	1,04
ЛПВП, ммоль/л	1,34	1,02	1,65	0,30
ЛПНП, моль/л	2,89	1,99	4,07	1,08
ТГ, моль/л	1,54	0,64	2,93	0,87
ЛПОНП, моль/л	0,71	0,29	1,35	0,40
ИА	3,15	1,58	5,37	2,51

Полученные результаты УЗИ сердца (таблица 51) позволяют констатировать преобладание нормального БДМ (67%) у данной категории пациентов. Обращает внимание повышение среднего давления в легочной артерии. Структура морфо-функциональных типов поражения сердца приводится на диаграмме 28.

Таблица 51

Результаты ультразвукового исследования сердца у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ (n-16)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ЛП, мм	37,05	33,00	44,50	5,30
КДО, мл	127,09	88,00	224,00	66,46
КСР, см	3,29	2,80	3,40	0,67
КДР, см	4,79	4,40	5,30	0,63
ПЖ, см	2,55	2,40	2,70	0,25
ФВ %	57,17	50,00	66,00	5,67
МЖП, мм	10,88	10,00	12,00	1,32
ЗСЛЖ, мм	10,96	10,00	12,00	1,21
Средняя толщина стенок ЛЖ, см	1,09	1,00	1,20	0,13
ПП, мм	34,70	30,00	41,50	4,60
СДЛА, мм рт. ст.	24,20	16,20	38,40	12,33
ММ ЛЖ, г	227,10	177,24	327,92	84,66
ИОТС	0,46	0,41	0,55	0,06

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

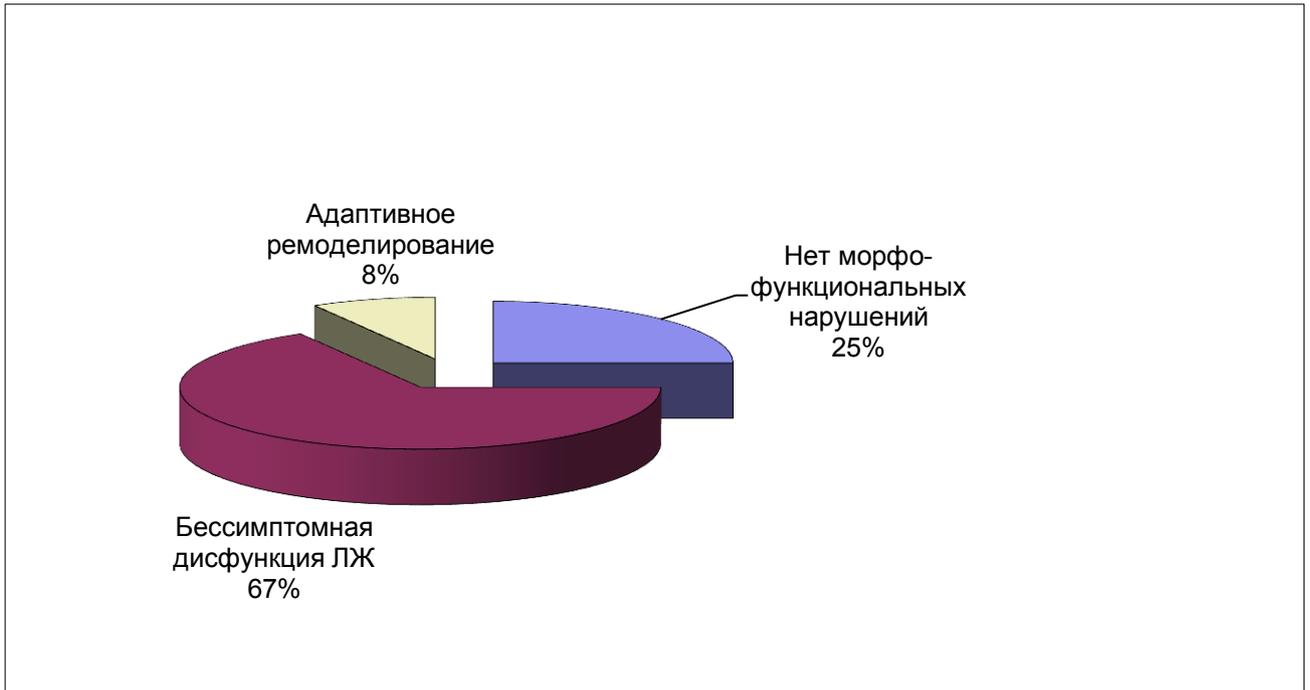


Диаграмма 27. Структура типов морфо-функциональных изменений сердца в группе больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ

На основании проведенного ангиографического исследования выявлен стенозирующий характер коронарного атеросклероза (таблица 52). Однако не обнаружено корреляции тяжести поражения коронарного русла с ФК ХСН и показателями УЗИ сердца.

Всем пациентам с нестабильной стенокардией выполнена специальная программа обследования (таблица 53). Средние значения СРБ, ЛПА, NT-proBNP и дефензинов, а также ИЛ-6 и ФНО в сыворотке крови были выше нормативных диапазонов, что свидетельствовало об активности провоспалительных и гемодинамических повреждающих факторов.

Таблица 52

Состояние коронарного кровообращения в группе больных ИБС нестабильного течения в сочетании с ГБ (n-17)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ПМЖА прокс., %	59,00	55,00	64,00	4,58
ПМЖА сред., %	77,60	58,00	101,00	17,67
ПМЖА дист., %	55,00	47,00	63,00	11,31
ОА сред., %	82,00	62,00	82,00	12,3
ОА дист., %	93,25	67,00	103,00	17,52
ПКА прокс. %	38,00	35,00	41,00	4,24
ПКА сред. %	58,50	56,00	61,00	3,54
ПКА дист., %	53,00	40,00	67,00	13,53
ЛВГА, %	52,50	30,00	75,00	31,82
ЗМЖА, %	76,75	55,00	92,00	15,56

Проведен статистический анализ значимости различий показателей специального этапа исследования у больных нестабильной стенокардией и здоровых лиц (таблица 53). Выявлено, что величина ЛВСЛ, содержание ЛПа, дефензинов, NT-proBNP и ИЛ-6 в сыворотке крови, а также NT-proBNP и дефензинов в лейкоцитарных супернатантах значимо выше у больных ИБС с нестабильной стенокардией (таблица 53).

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

Таблица 53

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

Показатель	Группа больных ИБС нестабильного течения в сочетании с ГБ Median (percentel 10/90) (n-19)	Группа здоровых лиц Median (percentel 10/90) (n-33)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,21 (0,19/0,24)	0,13(0,1/0,15)	0,1
СРБ в сыворотке, мг/л	7,26 (1,62/15,10)	2,30 (0,22/2,3)	0,07
СРБ в супернатанте, мкг/л	29,23 (6,85/59,95)	18,34 (1,7/32,6)	0,1
ЛПа в сыворотке, нг/мл	35,35 (31,75/37,85)	8,68 (5,66/8,68)	0,05
ЛПа в супернатанте, нг/мл	44,12 (32/53,2)	25,60 (13,53/45,85)	0,2
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	4,52 (3,09/6,05)	1,92 (0,8/1,92)	0,3
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	1,79 (0,67/2,81)	0,26 (0/0,51)	0,7
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	185,35 (65/698,76)	39,38(0/120,35)	0,05
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	88,31(11,02/203,40)	18,25 (0/35,39)	0,03
Дефензины в сыворотке, пг/мл	6004,88(2170,60/10396)	626,37 (270,40/1376,00)	0,04
дефензины в супернатанте, пг/мл	650560(204850/1034500)	117206,1(11420/200000)	0,01
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	12,85 (1,6/52,4)	1,04 (0,8/1,5)	0,02
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	3,75 (0/18,75)	5,34 (0/24,4)	0,1

Путем построения ROC кривых определена разделительная эффективность изученных биомаркеров между больными со стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией (таблица 54, диаграмма 28).

Значение ЛВСЛ у больных ИБС нестабильного течения более 0,18 ммоль/л по величине AUC расценивается как хороший, а значение сывороточной концентрации дефензинов более 4000 пг/мл – как средний разделительный критерий стабильного и нестабильного течения заболевания (таблица 54 и диаграмма 28).

Таблица 54

Разделительная эффективность определения ЛВСЛ у больных ИБС стабильного и нестабильного течения в сочетании с ГБ (ROC анализ)

Показатели	ЛВСЛ исходно ммоль/л	дефензины в сыворотке пг/мл
TP (True Positives)/FP (False Positives)	10,00	7,00
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	0,00	3,00
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	1,00	0,70
AUC (площадь под графиком)	0,77	0,65
Максимум sp+se	1,72	1,30
Значение показателя в максимуме	0,18	4000,00
Чувствительность в максимуме	1,00	0,70
Специфичность в максимуме	0,72	0,60

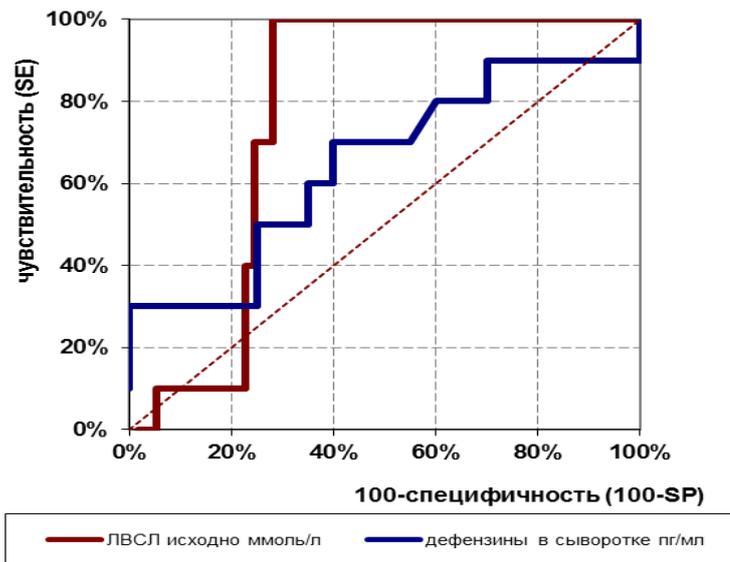


Диаграмма 28. ROC кривые, построенные по значениям ЛВСЛ и концентрации дефензинов в сыворотке крови у больных стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ

Для комплексной оценки разделительной эффективности двух показателей – величины ЛВСЛ и значения концентрации дефензинов 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 в сыворотке крови. По значению γ проведен ROC анализ, выявивший у данной математической модели отличные разделительные свойства между больными ИБС с нестабильной и стабильной стенокардией (AUC-0,94) (диаграмма 29).

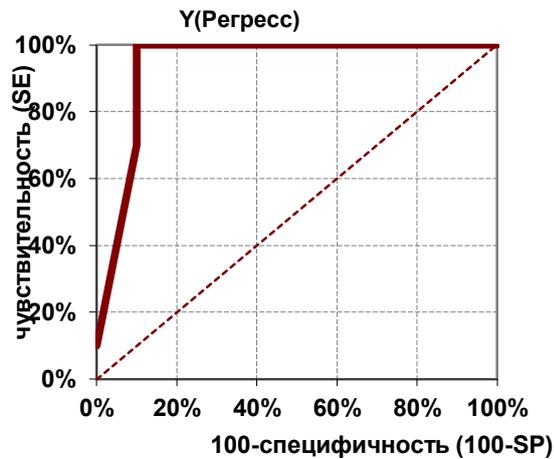


Диаграмма 29. ROC кривая, построенная по значениям γ у больных стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ

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 γ на 0,89%, концентрации дефензинов в сыворотке крови - на 0,11%, что свидетельствует о главенствующей роли величины ЛВСЛ в разделении этих клинических форм ИБС.

По значению точек разделения, определенных у больных ИБС стабильного течения, для группы больных нестабильной стенокардии построена диаграмма Парето (диаграмма 30). Анализ диаграммы Парето показал, что имеет место большая частота выявляемости высоких значений всех изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ИБС нестабильного течения.

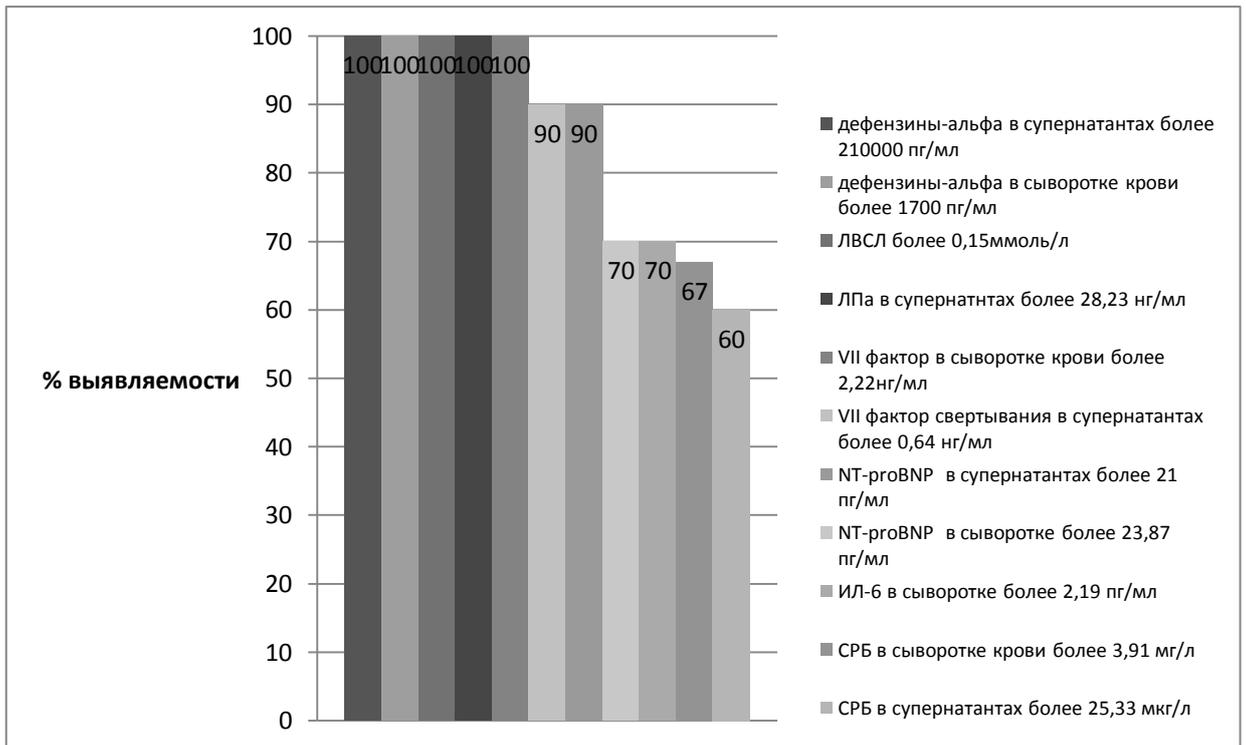


Диаграмма 30. Диаграмма Парето, построенная по выявляемости высоких значений сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ИБС нестабильного течения в сочетании с ГБ

Результаты корреляционного анализа представлены в таблицах 55-59. Выявлено, что у пациентов с ИБС нестабильного течения имеется сильная прямая связь ЛВСЛ с показателями, характеризующими размеры левых отделов сердца и толщину стенки ЛЖ (таблица 55). Установлена сильная прямая взаимосвязь между содержанием в супернатантах СРБ и дефензинов, а также количеством лейкоцитов крови и концентрацией СРБ в лейкоцитарных супернатантах (таблица 56). Определена прямая умеренной силы взаимосвязь между размерами ЛП и концентрацией СРБ в супернатантах (таблица 57). Содержание ЛПА и NT-proBNP в сыворотке имеют прямую умеренной силы связь ($R=0,66$, $p=0,04$). Взаимосвязь между концентрацией VIIф и БСЖК в сыворотке крови носит прямой характер (сильная связь), а с ФВ ЛЖ - обратный (умеренной силы связь) (таблица 57). Содержание в сыворотке крови дефензинов, количество лейкоцитов крови, линейные размеры предсердий и масса миокарда ЛЖ имеют сильную прямую связь, а сывороточная концентрация дефензинов и тяжесть ремоделирования сердца - прямую умеренной силы (таблица 58). Установлена прямая сильная

взаимосвязь между количеством лейкоцитов крови, размером левого предсердия и концентрацией ИЛ-6 в сыворотке крови (таблица 59). Взаимосвязей между изучаемыми маркерами и «традиционными» липидными факторами не установлено.

Таблица 55

Корреляции ЛВСЛ с лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ЛВСЛ, ммоль/л	Размер ЛП, мм	0,94	0,0002
ЛВСЛ, ммоль/л	КДО ЛЖ, мл	0,76	0,0167
ЛВСЛ, ммоль/л	Размер ПЖ, мм	0,83	0,0061
ЛВСЛ, ммоль/л	Толщина МЖП, мм	0,79	0,0065
ЛВСЛ, ммоль/л	Толщина ЗСЛЖ, мм	0,79	0,0065
ЛВСЛ, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	0,67	0,0473

Таблица 56

Корреляции содержания СРБ в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах с лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
СРБ в супернатанте, мкг/л	дефензины в супернатанте, пг/мл	0,74	0,0135
СРБ в супернатанте, мкг/л	ИЛ 6, пг/мл	0,66	0,0382
СРБ в супернатанте, мкг/л	Лейкоциты крови, 10^9 в л.	0,74	0,0373
СРБ в супернатанте, мкг/л	Размер ЛП, мм	0,83	0,0194

Таблица 57

Корреляции содержания VII ф в сыворотке крови с другими изучаемыми лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	БСЖК в сыворотке, пг/мл	0,85	0,0020
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	ФВ ЛЖ, %	-0,65	0,0417

Таблица 58

Корреляции содержания в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах дефензинов с другими изучаемыми лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
Дефензины в сыворотке, пг/мл	Тип ремоделирования (1-3)	0,68	0,0299
Дефензины в супернатанте, пг/мл	Лейкоциты. 10^9 в л.	0,71	0,0474
Дефензины в супернатанте, пг/мл	Размер ЛП, мм	0,80	0,0311
Дефензины в супернатанте, пг/мл	ММЛЖ, г.	0,81	0,0076
Дефензины в супернатанте, пг/мл	Размер ПП, мм	0,75	0,0332

Корреляции содержания ИЛ-6 в сыворотке крови с другими изучаемыми лабораторными и инструментальными показателями у больных ИБС с нестабильной стенокардией в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	Лейкоциты, 10^9 в л.	0,88	0,0040
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	Размер ЛП, мм	0,81	0,0279

Резюме

Таким образом, установлено, что величина ЛВСЛ, содержание в сыворотке крови ЛПА, дефензинов-альфа, NT-proBNP и ИЛ-6, а в лейкоцитарных супернатантах - NT-proBNP и дефензинов-альфа были значимо выше у больных ИБС нестабильного течения, чем у здоровых лиц. Выявлены достоверные различия больных ИБС стабильного и нестабильного течения 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). 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 γ на 0,89%, концентрации дефензинов в сыворотке крови - на 0,11%, что свидетельствует о главенствующей роли величины ЛВСЛ в разделении этих клинических форм ИБС.

Анализ диаграммы Парето показал, что у больных нестабильной стенокардией частота выявляемости высоких значений изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов высокая (по большинству показателей приближается к 100%).

У больных ИБС нестабильного течения отмечена прямая взаимосвязь показателей, характеризующих противoinфекционный ответ (содержание дефензинов в сыворотке) с размерами ЛП, массы миокарда ЛЖ и тяжестью типа ремоделирования сердца.

ГЛАВА 5

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ
ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ
КОНЕЧНОСТЕЙ ВСОЧЕТАНИИ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Группу больных с ОААНК характеризовало наличие нейтрофильного лейкоцитоза и признаков угнетения фибринолиза (таблицы 60-61).

Таблица 60

Показатели гемограммы у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в сочетании с ГБ и у здоровых лиц

	Группа больных ОААНК в сочетании с ГБ - Median (percentel 10/90) (n-52)	Группа сравнения - Median (percentel 10/90) (n-33)	P
Эритроциты, 10^{12} в л	4,60 (3,70;5,10)	4,97 (4,38;5,67)	0,6
Гемоглобин, г/л	139,50 (119,00; 155,00)	142,13 (126,00; 158,00)	0,3
Лейкоциты, 10^9 в л.	7,94 (5,10; 11,00)	6,13 (4,93; 8,30)	0,9
Эозинофилы, %	2,00 (1,00;5,00)	3,1 (0,00;5,00)	0,7
Эозинофилы, 10^9 в л	0,18 (0,05;0,49)	0,78 (0,02;1,51)	0,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	62,00 (50,00;77,00)	64,78 (51,00;73,00)	0,6
Сегментоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	4,82 (3,13;7,26)	3,44 (2,37;6,11)	0,04
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,00 (1,00;6,00)	2,24 (0,00;5,00)	1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	0,15 (0,02;0,54)	0,09 (0,00;0,24)	0,9
Лимфоциты, %	24,00 (13,00;40,00)	26,89 (18,00;34,00)	0,9
Лимфоциты, 10^9 в л.	1,82 (0,85;3,19)	1,51 (0,97;2,99)	0,8
моноциты, %	6,00 (2,00;11,00)	5,68 (3,00;8,00)	0,9
Моноциты, 10^9 в л.	0,40 (0,18;1,03)	0,33(0,15;0,71)	1,0
СОЭ, мм/час	12,13(6,00;23,00)	7,54 (3,00;17,00)	0,8
Тромбоциты, 10^9 в л.	278,00 (208,0;359,0)	287,25 (226,0;351,0)	0,8

Таблица 61

Биохимические показатели у больных ОААНК в сочетании с ГБ (n-52)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Глюкоза, моль/л	5,75	4,28	6,37	3,92
Креатинин, мкмоль/л	92,68	57,30	120,00	33,52
СКФ мл/мин.	88,86	75,38	108,90	14,55
Холестерин, моль/л	5,49	4,20	6,80	1,13
АПТВ, сек.	34,75	27,00	42,00	6,12
ПТВ, сек	16,02	12,00	18,00	11,67
ТВ, сек	15,46	12,60	18,70	2,01
Фибриноген, г/л	3,79	2,80	5,57	1,07
ХЗФ, мин	22,64	8,00	50,00	18,81

Клинико-инструментальные показатели состояния артерий в группе больных ОААНК представлены в таблице 62.

Таблица 62

Состояние артерий нижних конечностей у больных ОААНК в сочетании с ГБ

Показатель	М; 10%; 90%
Длительность боли в ногах (лет)	3,7; 1,0; 10,0
ДБХ исходно (м)	85,8; 0,0; 200,0
ЛПИ исходно	0,49; 0,25; 0,71

Средняя продолжительность боли в ногах составила 3,7 (P10% - 1,0, P90%- 10) лет, дистанция безболевого ходьбы (ДБХ) составила в среднем 85,8(P10%;- 10, P90%- 200)м, что соответствует IIб стадии ишемии нижних конечностей по Фонтейну - Покровскому. ЛПИ в среднем равнялся 0,49 (P10%;- 0,25, P90%- 0,71), что соответствует выраженному атеросклеротическому повреждению артерий ног и отражает степень ишемии на грани критической. Структура ХАН в данной группе больных приведена в разделе 2.3.2.

Результаты дуплексного сканирования и ультразвуковой доплерографии артерий нижних конечностей представлены в таблице 63.

Таблица 63

Состояние кровотока нижних конечностей у больных ОААНК в сочетании с ГБ (n-52)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
П КИМ ОБА, мм	1,55	1,30	1,90	0,25
П БА ЛСК, см/с	49,93	30,00	68,00	14,31
П ПКА ЛСК, см/с	29,50	15,00	50,05	12,97
П ЗББА ЛСК, см/с	20,77	8,00	43,00	13,50
П ЗББА АД, мм рт ст	98,10	40,00	160,00	46,49
П ПББА ЛСК, см/с	18,77	5,00	38,00	12,66
П ПББА АД, мм рт ст	98,89	40,00	170,00	54,23
П АТС ЛСК, см/с	16,00	15,00	17,00	1,41
П ЛПИ	0,64	0,30	1,00	0,28
Л КИМ ОБА, мм	1,33	1,00	1,50	0,24
Л БА ЛСК, см/с	46,68	25,00	61,00	11,56
Л ПКА ЛСК, см/с	26,93	13,00	40,00	11,02
Л ЗББА ЛСК, см/с	18,43	9,50	30,00	8,88
Л ЗББА АД, мм рт ст	96,30	50,00	190,00	48,84
Л ПББА ЛСК, см/с	16,70	8,00	28,00	8,18
Л ПББА АД, мм рт ст	91,92	50,00	140,00	44,18
Л ПББА АД после операции, мм рт ст	139,17	120,00	160,00	27,12
Л ЛПИ	0,60	0,37	0,92	0,23

Пояснения к таблице: П- правая, Л-левая, ЛСК- линейная скорость кровотока, АД- артериальное давление, ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс, КИМ-комплекс интима-медиа, БА- бедренная артерия, ПКА – подколенная артерия, ЗББА- задняя большеберцовая артерия, ПББА - передняя большеберцовая артерия, АТС- артерия тыла стопы.

Комментируя полученные данные, можно констатировать наличие исходно выраженного ограничения артериального кровотока в нижних конечностях. Среднее значение стеноза в исследуемых артериях составило 96% (percentil 10/90-

30/100). Определена слабая корреляция степени стеноза артерий и тяжести ХАН ($R=0,2$, $p=0,034$), 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 ($R=-0,6$, $p=0,029$).

Была произведена оценка морфологической структуры атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий нижних конечностей. Согласно приведенной в главе 2 классификации атеросклеротических бляшек [6] по данным дуплексного сканирования, имеющиеся у пациентов с ОААНК изменения сосудистой стенки разделены на следующие типы: II тип - гетерогенные бляшки с преобладанием гипоэхогенных структур, IV тип - плотные гомогенные бляшки, V тип – гиперэхогенные бляшки с кальцинозом и особый тип – бляшки с признаками тромбоза (диаграмма 31). Анализ структуры морфологии атеросклеротических бляшек показал, что в данной группе пациентов были как лица со «стабильными» бляшками (IV и V тип), так и с «нестабильными» (II и особый тип). Кроме того определен уровень поражения артерий: 1 тип - дистальное поражение, 2 тип - проксимальное поражение, 3 тип - тотальное поражение (диаграмма 32). Выявлено, что преобладали пациенты с проксимальным и тотальным типом поражения артерий.

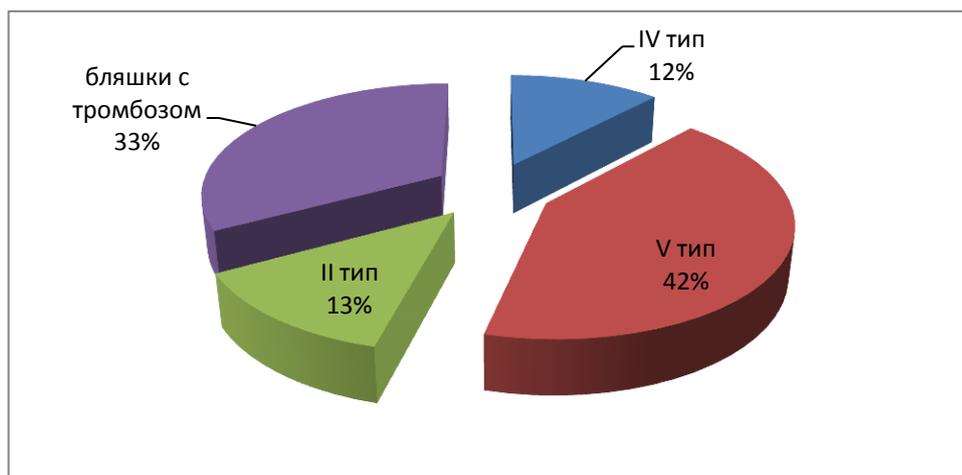


Диаграмма 31. Структура атеросклеротических бляшек у больных ОААНК в сочетании с ГБ

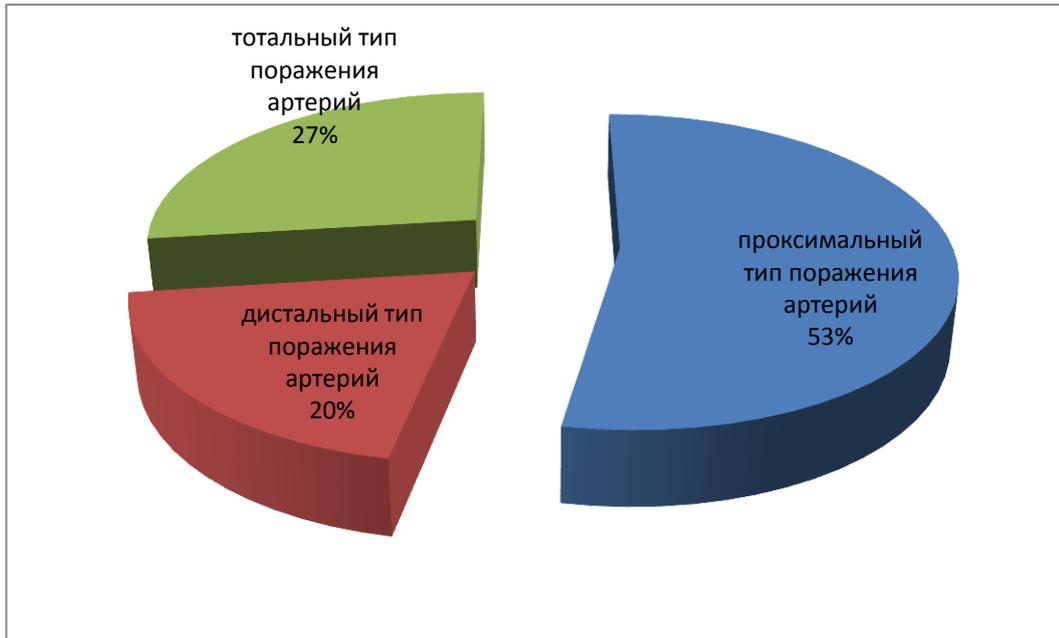


Диаграмма 32. Уровень поражения артерий по данным дуплексного сканирования и ангиографии артерий нижних конечностей у больных ОААНК в сочетании с ГБ

Всем пациентам с ОААНК проведено специальное исследование сывороточных и лейкоцитарных факторов (таблица 64). Выявлено, что содержания в сыворотке СРБ, дефензинов и ИЛ-6 выходили за нормативный диапазон.

Показано, что у больных ОААНК в сравнении со здоровыми лицами, значимо выше содержание в супернатантах СРБ, ЛПа, в сыворотке крови дефензинов-альфа, а также величина ЛВСЛ.

Проведена оценка разделительной эффективности изучаемых показателей между больными ОААНК и здоровыми лицами посредством ROC анализа (таблица 65, диаграмма 33). Изучаемые показатели по своей эффективности распределились следующим образом: значение концентрации ЛПа в лейкоцитарных супернатантах более 35,21 нг/мл расценено как отличный разделительный критерий между больными ОААНК и здоровыми лицами, содержание дефензинов в сыворотке крови свыше 1300 пг/мл и величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л – как хороший, концентрация СРБ в супернатантах более 19,5 мкг/л и ФВ более 0,05 ЕД/мл – как средний.

Таблица 64

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

Показатель	Группа больных ОААНК в сочетании с ГБ Median (percentel 10/90) (n-52)	Группа здоровых лиц Median (percentel 10/90) (n-33)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,16 (0,09/0,24)	0,13(0,1/0,15)	0,01
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)	0,04
ЛПА в супернатанте, нг/мл	56,54 (41,09/61,7)	25,60 (13,53/45,85)	0,02
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)	0,04
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

Таблица 65

Результаты ROC анализа различий содержания биомаркеров в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах у больных ОААНК в сочетании с ГБ и здоровых лиц

	ЛВСЛ исходно ммоль/л	СРБ в супернатанте мкг/л	ЛПА в супернатанте нг/мл	дефензины в сыворотке пг/мл	ФВ в супернатанте ЕД/мл
TP (True Positives)/FP (False Positives)	40,00	10,00	10,00	8,00	8,00
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	31,00	5,00	1,00	7,00	7,00
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	0,56	0,67	0,91	0,53	0,53
AUC (площадь под графиком)	0,70	0,69	0,97	0,74	0,68
Максимум sp+se	1,48	1,37	1,83	1,45	1,39
Значение показателя в максимуме	0,15	19,50	35,21	1300,00	0,05
Чувствительность в максимуме	0,56	0,67	1,00	0,60	0,47
Специфичность в максимуме	0,83	0,53	0,83	0,85	0,92

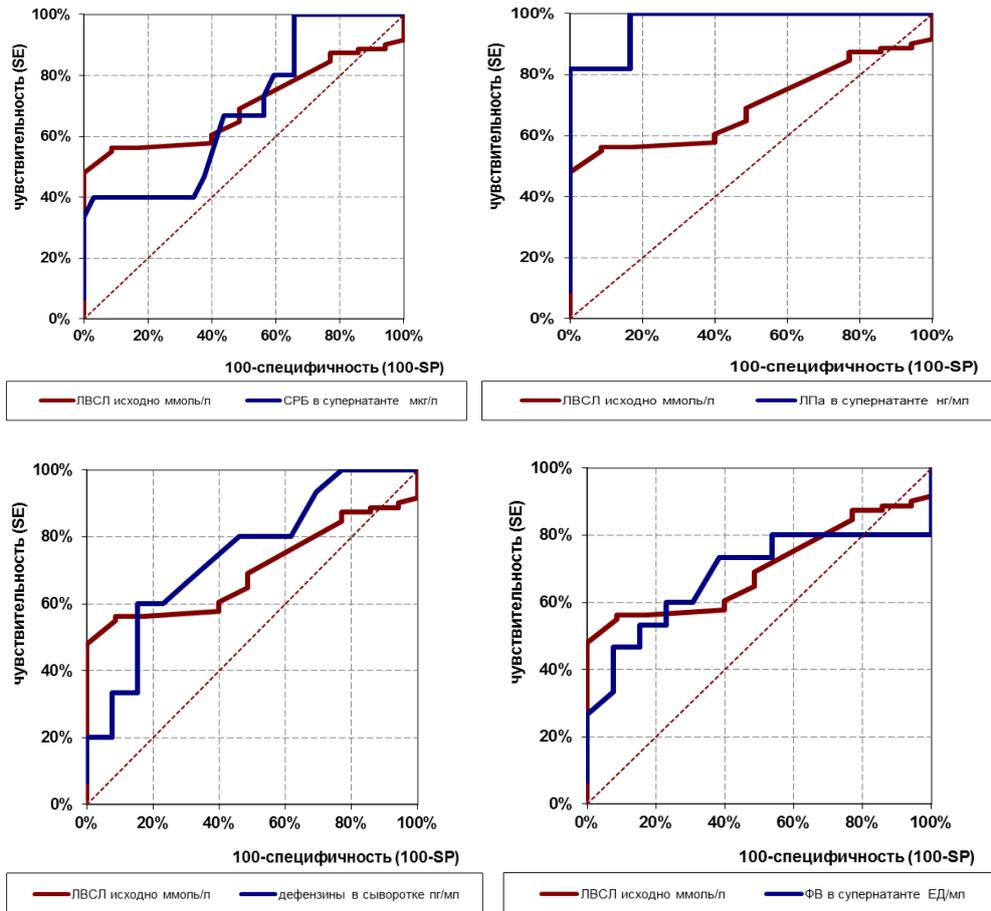


Диаграмма 33. ROC кривые, построенные по значениям изучаемых биомаркеров у больных ОААНК в сочетании с ГБ

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, содержание СРБ в супернатантах более 19,5 мкг/л, ЛПА - более 35,21 нг/мл, ФВ - более 0,05 ЕД/мл и концентрация дефензинов-альфа в сыворотке крови - более 1300 пг/мл.

Диаграмма Парето построена для всей группы больных ОААНК (диаграмма 34) и по подгруппам в зависимости от экоструктуры бляшек (диаграмма 35 и 36) и уровня поражения артериального русла нижних конечностей (диаграмма 37-39).

Анализ построенных диаграмм Парето выявил, что у больных ОААНК наиболее часто выявляемый белковый фактор в лейкоцитарных супернатантах - ЛПА. При появлении признаков нестабильности бляшки возрастает частота выявляемости высоких концентраций СРБ в лейкоцитарных супернатантах. Проксимальный тип поражения артериального русла также ассоциирован с более

частым выявлением в супернатантах высоких концентраций СРБ, а при дистальном типе возрастает частота обнаружения большой концентрации дефензинов в сыворотке крови.

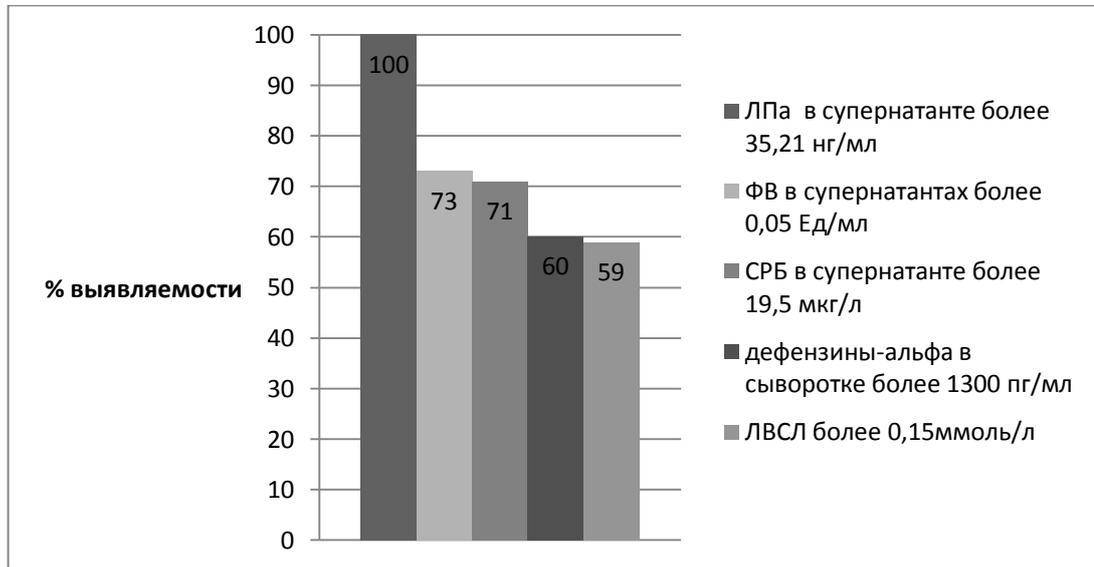


Диаграмма 34. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ

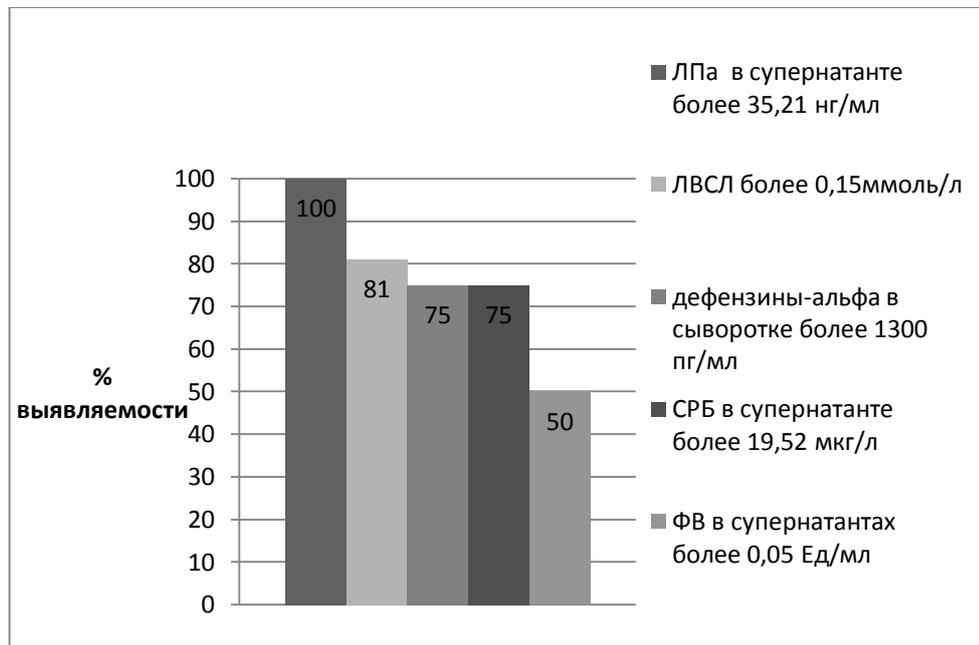


Диаграмма 35. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ со "стабильными" бляшками

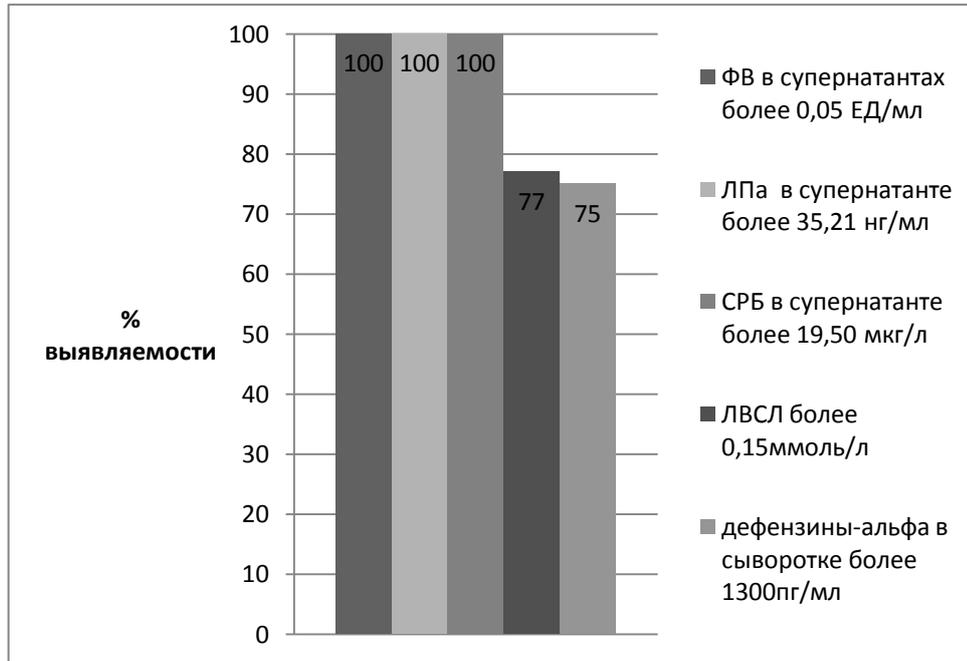


Диаграмма 36. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ с "нестабильными" бляшками

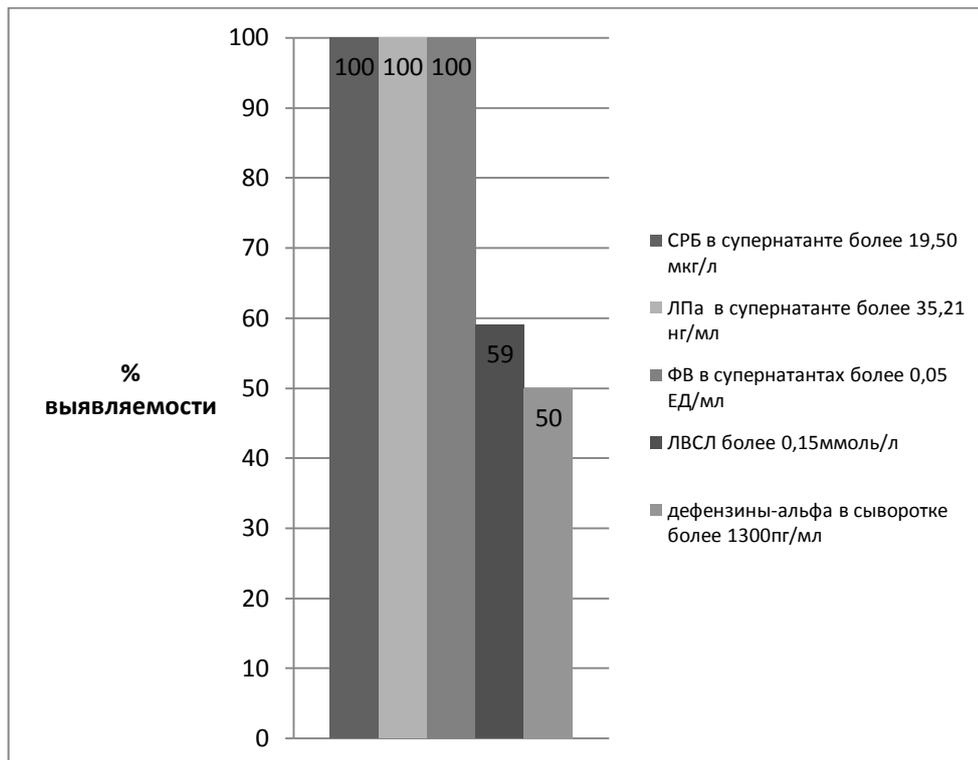


Диаграмма 37. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ с проксимальным типом поражения сосуда

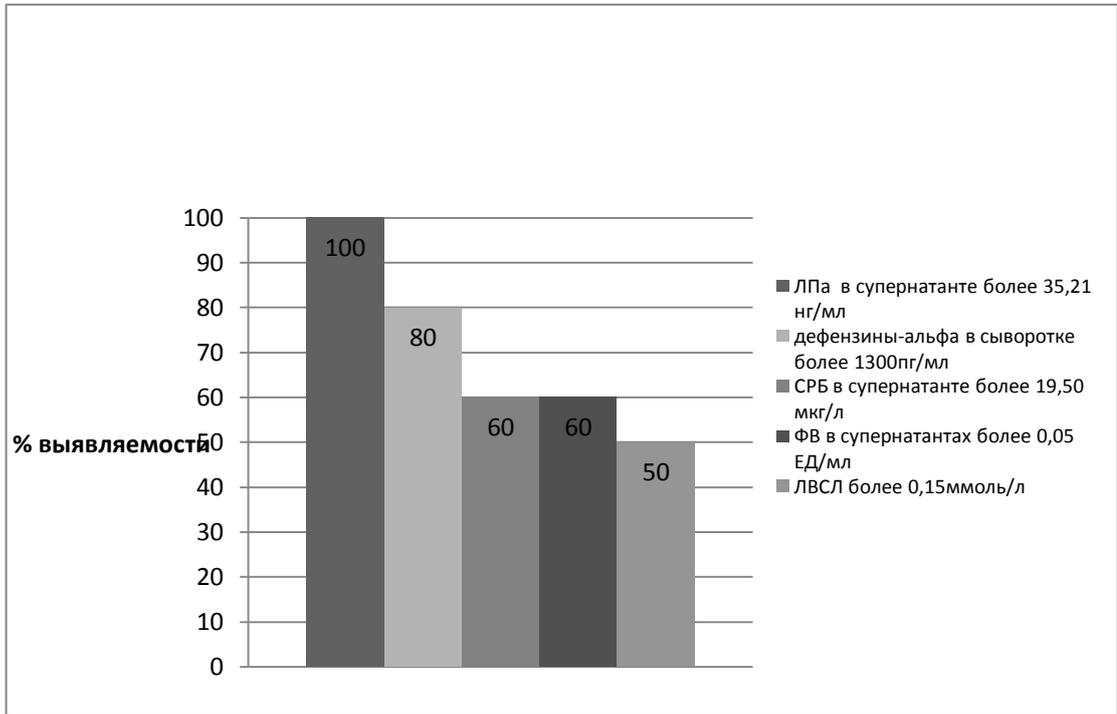


Диаграмма 38. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ с тотальным типом поражения сосудистого русла

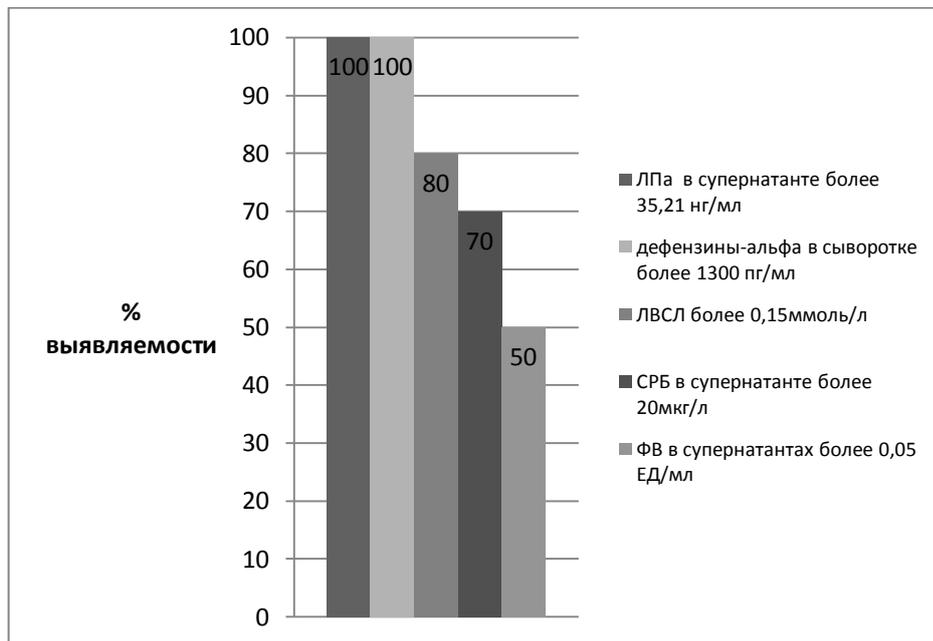


Диаграмма 39. Диаграмма Парето, построенная по точкам разделения сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ОААНК в сочетании с ГБ с дистальным типом поражения артериального русла

У пациентов с ОААНК, имеющих признаки «нестабильных» и «стабильных» атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий, проведен ROC анализ разделительной эффективности изученных биомаркеров. Установлено, что из всех факторов наилучшую разделительную эффективность имеет значение концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л (AUC-0,95).

Значение концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах для разделения «стабильного» и «нестабильного» характера атеросклеротического поражения сосудистого русла подтверждается данными корреляционного анализа. Установлена сильная прямая взаимосвязь «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 выявленных различий белково-пептидного паттерна больных ОААНК от здоровых лиц выбраны следующие показатели: концентрация в супернатантах СРБ, ЛПа, а также сывороточное содержание дефензинов и величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии: $y = -58,697 + 97,496 * x_1 + 0,17927 * x_2 + 0,7043 * x_3 +$

$0,003719935 * x_4$, где x_1 - величина ЛВСЛ, x_2 - концентрация в супернатантах СРБ, x_3 - концентрация в супернатантах ЛПа, x_4 - сывороточная концентрация дефензинов. Для оценки эффективности построенной модели для разделения больных ОААНК и здоровых проведен ROC анализ (таблица 66, диаграмма 40).

Данная модель по показателю AUC имеет отличные разделительные свойства.

Результаты ROC анализа отличий белково-пептидного паттерна у больных ОААНК в сочетании с ГБ и здоровых лиц

<i>Показатель</i>	<i>значение</i>
TP (True Positives)/FP (False Positives)	10
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	1
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	90,91%
AUC (площадь под графиком)	1,00
Максимум sp+se	2,00
Значение показателя в максимуме	0,02
Чувствительность в максимуме	1,00
Специфичность в максимуме	1,00

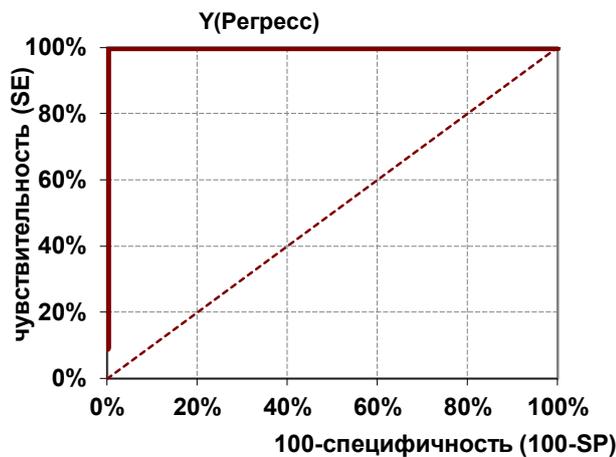


Диаграмма 40. ROC кривая, построенная по значению γ у больных ОААНК в сочетании с ГБ

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 γ на 0,36%, концентрации СРБ и ЛПа в лейкоцитарных супернатантах - на 0,09% и 0,49% соответственно, а значения сывороточного содержания дефензинов – на 0,05%.

Проведен статистический анализ отличий изучаемых биомаркеров у больных ОААНК и ИБС со стабильной стенокардией напряжения (таблица 67).

Из представленных данных следует, что у больных ОААНК значимо выше, чем у пациентов с ИБС, содержание в супернатантах СРБ и ЛПа и ниже концентрация ФВ, VIIф, NT-проBNP, дефензинов-альфа в супернатантах, а в сыворотке крови - VIIф, дефензинов-альфа, NT-проBNP, ИЛ-6 и ИЛ-8.

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

Показатель	Группа больных ОААНК в сочетании с ГБ Median (persentel 10/90)(n-52)	Группа больных ИБС в сочетании с ГБ Median (persentel 10/90) (n-47)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,16 (0,09/0,24)	0,16 (0,09/0,25)	0,15
СРБ в сыворотке, мг/л	4,82 (0,45/19,12)	6,99 (1,88/10,29)	0,087
СРБ в супернатанте, мкг/л	59,16 (9,15/189,3)	49,57 (16,25/106)	0,04
ЛПА в супернатанте, нг/мл	56,54 (41,09/61,7)	37,73 (23,55/55,25)	0,02
ФВ в супернатантах, ЕД/мл	0,04(0,01/0,06)	1,1(0,87/1,37)	0,04
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	0,96(0,27/1,53)	5,59 (3,34/8,8)	0,001
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	0,2 (0/0,28)	2,38 (0,72/4,51)	0,001
NT-проBNP в сыворотке, пг/мл	114,67 (0/561,89)	499,89 (29/2154)	0,001
NT-проBNP в супернатанте, пг/мл	6,25(0/22,88)	157,12(23,73/257,64)	0,001
Дефензины в сыворотке, пг/мл	1779,8(419,6/4888)	4389,94(2096,6/7932,0)	0,001
Дефензины в супернатанте, пг/мл	147933(31260/200000)	656635(406000/921150)	0,001
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	9,4 (8/10)	12,67 (1,3/52,64)	0,001
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	4,59 (0/17,7)	48,13 (0/154,25)	0,04

Проведенный ROC анализ выявил, что наилучший разделительный маркер между больными ОААНК и ИБС со стабильной стенокардией напряжения – концентрация ЛПА в лейкоцитарных супернатантах свыше 56,68 нг/мл (AUC-0,9).

Для оптимальной комплексной оценки различий белково-пептидного паттерна больных ОААНК и ИБС со стабильной стенокардией отобраны следующие показатели: концентрация в лейкоцитарных супернатантах СРБ, ЛПА, дефензинов, VIIф, в сыворотке – дефензинов, СРБ и VIIф, на основании которых построено уравнение регрессии: $y=9,633+0,03202*x_1+0,2986*x_2-1,0676*x_3-0,001525253*x_4-0,000033335*x_5-0,06426*x_6-2,32772*x_7$, где x_1 - концентрация СРБ в лейкоцитарных супернатантах, x_2 – концентрация ЛПА в супернатантах, x_3 - концентрация VIIф в супернатантах, x_4 - сывороточная концентрация дефензинов-альфа, x_5 - концентрация дефензинов в супернатантах, x_6 - сывороточная концентрация СРБ, x_7 - сывороточная концентрация VIIф. Путем проведения ROC анализа установлено, что построенная математическая модель, имеет максимальную разделительную эффективность между данными клиническими формами атеросклероза (AUC-1). Для показателей, включенных в данную модель,

определен средний процент отклика при изменении их значений на 1%. Установлено, что увеличение значения концентрации СРБ в супернатантах на 1% приводит к уменьшению значения γ на 0,09%, а концентрации ЛПА – на 1,25%. Показано, что прирост значения концентрации ВПФ в лейкоцитарных супернатантах на 1%, увеличивает значение γ на 0,07%, концентрации дефензинов в сыворотке крови – на 0,32%, концентрации дефензинов в супернатантах - на 1,23%, сывороточной концентрации СРБ – на 0,03%, сывороточной концентрации ВПФ - на 0,7%. Данный математический анализ выявил, что наибольшим значением в разделении этих заболеваний имеют концентрации в супернатантах ЛПА и дефензинов.

Корреляционный анализ изучаемых специальных показателей с клиническими, лабораторными и инструментальными параметрами (таблицы 68-70) выявил, что между величиной ЛВСЛ и ЛПИ, интегрально характеризующего тяжесть сосудистых поражений, имеется умеренной силы обратная взаимосвязь ($R=-0,48, p=0,001$). Содержание в сыворотке и супернатантах СРБ имело сильную прямую взаимосвязь (таблица 68). Показано, что корреляция концентрации СРБ в сыворотке и супернатантах с уровнем сывороточного ИЛ-6 носит умеренной силы прямой характер (таблица 68). Количество лейкоцитов крови имело умеренной силы прямую связь с содержанием в супернатантах NT-proBNP и в сыворотке с ИЛ-8. Установлена сильная связь количества лейкоцитов с сывороточной концентрацией дефензинов (таблицы 68-70). Определена прямая умеренно силы корреляция между концентрацией дефензинов-альфа в сыворотке крови и NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах (таблица 69). У больных ОААНК отмечена сильная прямая взаимосвязь корреляции холестерина сыворотки крови и содержанием в ней дефензинов-альфа ($R=0,8, p=0,02$) и ИЛ-8 ($R=0,8, p=0,04$).

Таблица 68

Корреляции содержания СРБ в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах с другими изучаемыми лабораторными показателями у больных ОААНК в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
СРБ в сыворотке, мг/л	СРБ в супернатанте, мкг/л	0,94	0,00001
СРБ в сыворотке, мг/л	ИЛ 6, пг/мл	0,68	0,0079
СРБ в супернатанте, мкг/л	ИЛ 6, пг/мл	0,65	0,0111

Таблица 69

Корреляции содержания NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах с другими изучаемыми лабораторными показателями у больных ОААНК в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	p
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	дефензины в сыворотке, пг/мл	0,61	0,0163
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	Лейкоциты крови. 10^9 в л	0,65	0,0436

Таблица 70

Корреляции содержания дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах и сыворотке крови с другими изучаемыми лабораторными показателями у больных ОААНК в сочетании с ГБ (критерий Спирмана)

Показатель 1	Показатель 2	R	P
дефензины в сыворотке, пг/мл	Лейкоциты крови, 10^9 в л	0,81	0,0050
дефензины в сыворотке, пг/мл	Холестилин, ммоль/л	0,75	0,0205

Резюме

Таким образом, результаты исследования показали, что больные ОААНК отличались увеличением ЛВСЛ, а также концентраций СРБ и ЛПа в супернатантах лейкоцитарных культур и дефензинов в сыворотке. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация дефензинов-альфа в сыворотке, СРБ и ЛПа в супернатантах, а также величина ЛВСЛ) для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн характерный для больных ОААНК. 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 γ на 0,36%, концентрации СРБ и ЛПа в лейкоцитарных супернатантах - на 0,09% и 0,49% соответственно, а значения сывороточного содержания дефензинов – на 0,05%.

Показано, что больные с признаками нестабильной бляшки и проксимального типа поражения артериального русла характеризовались увеличением концентрации СРБ в супернатантах лейкоцитарных культур. Установлено, что из всех факторов наилучшую разделительную эффективность между больными с «нестабильными» и «стабильными» атеросклеротическими бляшками имеет концентрация СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л (AUC-1). Выявленные корреляционные взаимосвязи содержания СРБ и ФВ

в супернатантах с «нестабильным» характером атеросклеротических бляшек позволяют использовать их (в первую очередь СРБ) для дифференциальной диагностики состояния сосудистой стенки.

Установлено, что у больных ОААНК в супернатантах выше концентрация СРБ и ЛПа, чем у пациентов с ИБС. Концентрации остальных (из изученных) сывороточных и лейкоцитарных факторов выше у больных ИБС. Проведенный ROC анализ выявил, что наилучший разделительный маркер между больными ОААНК и ИБС со стабильной стенокардией напряжения – концентрация ЛПа в лейкоцитарных супернатантах свыше 56,68 нг/мл (AUC-0,9). Для оптимальной комплексной оценки различий белково-пептидного паттерна больных ОААНК и ИБС со стабильной стенокардией отобраны следующие показатели: концентрация СРБ, ЛПа, дефензинов-альфа, VIIф в лейкоцитарных супернатантах, а в сыворотке – дефензинов-альфа, СРБ и VIIф, на основании которых построено уравнение регрессии. Установлено, что увеличение значения концентрации СРБ в супернатантах на 1% приводит к уменьшению значения γ на 0,09%, а концентрации ЛПа – на 1,25%. Показано, что прирост значения концентрации VIIф в лейкоцитарных супернатантах на 1%, увеличивает значение γ на 0,07%, концентрации дефензинов в сыворотке крови – на 0,32%, концентрации дефензинов в супернатантах - на 1,23%, сывороточной концентрации СРБ – на 0,03%, сывороточной концентрации VIIф - на 0,7%.

У больных ОААНК установлена прямая зависимость между показателями, маркерующими системный воспалительный ответ, связанными с функционированием нейтрофилов (дефензины и ИЛ-8), и концентрацией холестерина крови.

ГЛАВА 6

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ
АТЕРОСКЛЕРОЗОМ СОЧЕТАННОГО ТЕЧЕНИЯ,
АССОЦИИРОВАННЫМ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ**

Результаты общеклинических лабораторных исследований у больных сочетанным течением атеросклероза приводятся в таблицах 71-73.

Таблица 71

Показатели гемограммы у больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ и у здоровых лиц

	Группа больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ - Median (percentel 10/90) (n-38)	Группа сравнения - Median (percentel 10/90) (n-33)	P
Эритроциты, 10^{12} в л	4,30 (3,25;5,05)	4,97 (4,38;5,67)	0,6
Гемоглобин, г/л	131,50 (117,00; 153,00)	142,13 (126,00; 158,00)	0,3
Лейкоциты, 10^9 в л.	7,87 (6,10; 11,04)	6,13 (4,93; 8,30)	0,9
Эозинофилы, %	2,00 (1,00;6,00)	3,1 (0,00;5,00)	0,7
Эозинофилы, 10^9 в л	0,19 (0,07;0,49)	0,78 (0,02;1,51)	0,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	65,00 (51,00;75,00)	64,78 (51,00;73,00)	0,6
Сегментоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	4,69 (3,14;7,66)	3,44 (2,37;6,11)	0,05
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,00 (1,00;6,00)	2,24 (0,00;5,00)	1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, 10^9 в л	0,16 (0,02;0,49)	0,09 (0,00;0,24)	0,9
Лимфоциты, %	24,00 (12,00;37,00)	26,89 (18,00;34,00)	0,9
Лимфоциты, 10^9 в л.	1,77 (0,96;3,39)	1,51 (0,97;2,99)	0,8
Моноциты, %	7,00 (3,00;11,00)	5,68 (3,00;8,00)	0,9
Моноциты, 10^9 в л.	0,48 (0,20;1,05)	0,33(0,15;0,71)	1,0
СОЭ, мм/час	12,25(5,00;24,00)	7,54 (3,00;17,00)	0,8
Тромбоциты, 10^9 в л.	296,00 (234,0;387,0)	287,25 (226,0;351,0)	0,8

Биохимические показатели у больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ (n-38)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
Глюкоза, моль/л	5,09	3,90	6,00	0,87
Креатинин, мкмоль/л	97,00	57,30	191,00	48,69
СКФ мл/мин.	83,47	58,80	97,81	13,19
Холестерин, моль/л	5,14	3,90	6,40	1,07
АПТВ, сек,	35,17	27,00	42,00	6,64
ПТВ, сек	14,79	11,80	19,50	3,20
ТВ, сек	15,57	11,50	18,10	2,06
Фибриноген, г/л	4,14	2,80	6,29	1,33
ХЗФ, мин	27,00	27,00	27,00	

Также, как и в предыдущих группах наблюдения больных с клинически манифестным атеросклерозом у пациентов с сочетанным течением этой патологии можно констатировать наличие нейтрофильного лейкоцитоза, признаков угнетения фибринолиза (см. таблицы 71-72).

У больных этой группы было проведено доплерографическое исследование артерий нижних конечностей, результаты которого приводятся в таблице 73. У пациентов с поражением артерий нижних конечностей отмечались признаки тяжелого нарушения кровообращения в нижних конечностях (ЛПИ<0,5, низкие показатели линейной скорости кровотока). Величина ЛПИ имела умеренной силы обратную взаимосвязь с тяжестью ХАН (по классификации Фонтейна-Покровского) ($R=-0,59$, $p=0,02$).

Таблица 73

Состояние кровотока нижних конечностей у больных облитерирующим атеросклерозом в сочетании с ишемической болезнью сердца (n-23)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
П БА ЛСК, см/с	34,50	30,00	48,00	9,00
П ПКА ЛСК, см/с	19,75	15,00	25,00	4,27
П ЗББА ЛСК, см/с	11,25	5,00	17,00	5,06
П ЗББА АД, мм рт ст	62,50	40,00	80,00	17,08
П ПББА ЛСК, см/с	7,50	0,00	13,00	5,57
П ПББА АД, мм рт ст	60,00	0,00	120,00	60,00
П ЛПИ	0,46	0,20	0,80	0,26
Л БА ЛСК, см/с	44,75	39,00	52,00	6,29
Л ПКА ЛСК, см/с	22,50	13,00	39,00	11,62
Л ЗББА ЛСК, см/с	14,75	6,00	26,00	8,30
Л ЗББА АД, мм рт ст	96,67	50,00	130,00	41,63
Л ПББА ЛСК, см/с	13,67	8,00	23,00	8,14
Л ПББА АД, мм рт ст	93,33	50,00	130,00	40,41
Л ЛПИ	0,54	0,38	0,80	0,18

Результаты дуплексного сканирования магистральных ветвей грудной аорты, выполненного у пациентов этой группы, также свидетельствовали о

наличии стенозирующего атеросклероза. Средний процент стеноза выявленного брахиоцефальных артерий составил 50% (percentil 10/90- 30/67), а толщина комплекса интима-медиа -1,2мм (percentil 10/90- 1/1,4).

У 12 пациентов этой группы ранее проводилась коронароангиография, при которой зафиксировано стенозирующее поражение в среднем 4 артерий (percentil 10/90- 3/6).

67 % пациентов данной группы имели III ФК ХСН и 33% II ФК ХСН, определенный в модифицированном тесте 6 минутной ходьбы.

В таблице 74 приводятся результаты УЗИ сердца у больных сочетанным течением атеросклероза. Анализ средних значений показателей УЗИ сердца позволяет констатировать наличие у этих пациентов признаков дилатации предсердий, незначительного увеличения линейного размера левого желудочка, признаков гипертрофии левого желудочка, увеличения среднего давления в легочной артерии и снижения систолической функции сердца. Типы морфо-функционального ремоделирования у данной категории больных приведены на диаграмме 41. В структуре морфо-функциональных изменений у больных сочетанным течением атеросклероза преобладали пациенты с дезадаптивным и адаптивным ремоделированием сердца.

Таблица 74

Результаты ультразвукового исследования сердца у больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ (n-18)

	Median	Percentile - 10,0	Percentile - 90,0	Std.Dev.
ЛП, мм	41,67	36,00	48,00	4,91
КСР, см	4,3	3,50	5,65	0,90
КДР, см	5,73	4,80	7,00	0,92
ИКДР, см/м²	2,85	2,53	3,24	0,28
ПЖ, см	2,44	2,10	2,80	0,42
ФВ %	51,63	44,00	59,00	8,81
МЖП, мм	11,36	8,00	14,00	3,17
ЗСЛЖ, мм	11,36	9,00	12,30	1,45
Средняя толщина стенок ЛЖ, см	1,13	0,85	1,30	0,23
ИММЛЖ, г/м²	143,19	101,01	183,69	31,78
ММ ЛЖ, г	284,98	196,89	454,59	76,10
ПП, мм	44,57	35,00	56,00	6,97
СДЛА, мм рт. ст.	25,74	19,00	37,00	6,95
ИОТС	0,45	0,33	0,54	0,09

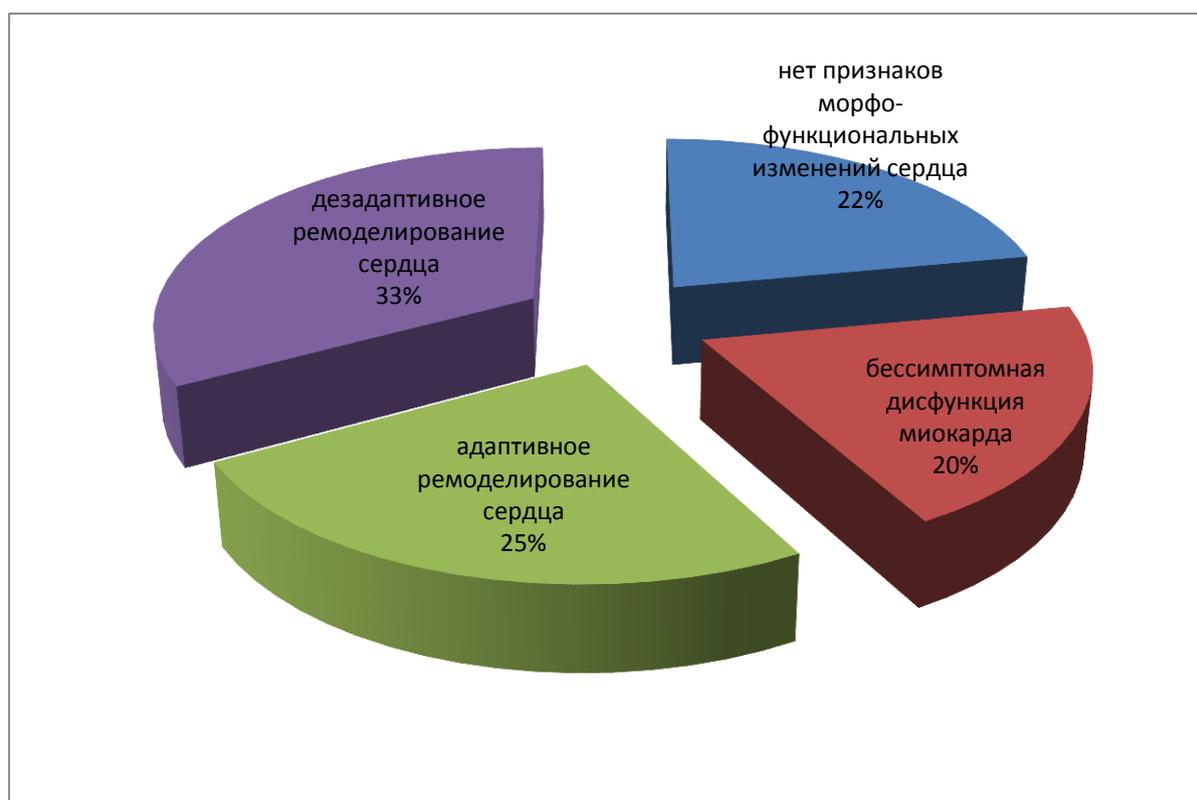


Диаграмма 41. Структура типов морфофункциональных изменений сердца у больных с сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ

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

Результаты специального исследования у больных сочетанным течением атеросклероза приводятся в таблице 75. Выявлено, что средние значения содержания в сыворотке СРБ, NT-proBNP, дефензинов, ИЛ-6 были выше нормы.

Проведен статистический анализ отличий результатов данной группы пациентов от здоровых лиц (таблица 75).

Установлено, что содержание в сыворотке СРБ, NT-proBNP, VII фактора свертывания и дефензинов было значимо выше у больных сочетанным течением атеросклероза, чем у здоровых лиц (таблица 75). Показано, что у пациентов данной группы достоверно более высокие, чем у здоровых, концентрации NT-proBNP, СРБ, ЛПа, VII фактора свертывания и дефензинов в лейкоцитарных

супернатантах. Величина ЛВСЛ у больных данной подгруппы также значимо превышала таковую у здоровых лиц группы сравнения (таблица 75).

Таблица 75

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

Проведено изучение разделительной эффективности исследуемых биомаркеров у больных сочетанным течением атеросклероза и здоровых лиц путем построения ROC кривых (таблица 76 и диаграмма 42). Исходя из анализа значений AUC сывороточная концентрация дефензинов-альфа более 1700 пг/мл расценивается как отличный разделительный критерий между больными сочетанным атеросклерозом и здоровыми лицами. Концентрация ЛПА в супернатантах более 28,59 нг/мл, дефензинов-альфа - более 210000 пг/мл, а в сыворотке крови СРБ - более 3,97 мг/л, VIIф - более 2,15 нг/мл и ИЛ-6 - выше 1,72 пг/мл оцениваются как очень хорошие критерии разделения. Величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л, содержание в лейкоцитарных супернатантах СРБ более 21

мкг/л, VII фактора свертывания более 0,69 нг/мл, NT-proBNP более 21 пг/мл, ФВ более 0,05 ЕД/мл, в сыворотке NT-proBNP более 47,74 пг/мл расцениваются как хорошие разделительные критерии. Содержание в лейкоцитарных супернатантах VПф - более 0,69 нг/мл и ИЛ-8 в сыворотке крови более 4,89 пг/мл - как средние по эффективности дифференциально-диагностические критерии (таблицу 76, диаграмма 42).

По полученным точкам разделения построена диаграмма Парето (диаграмма 43). Установлено, что в супернатантах больных сочетанным атеросклерозом наиболее часто выявляются высокие концентрации дефензинов, ЛПА и СРБ. ЛВСЛ, превышающая 0,15 ммоль/л, также часто выявляемый показатель у пациентов данной группы. Для сравнения построена диаграмма Парето у здоровых лиц (диаграмма 44).

Результаты ROC анализа различий содержания биомаркеров в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах у больных с сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБи здоровых лиц

	ЛВСЛ исходно ммоль/л	СРБ в супернатанте мкг/л	ЛПв в супернатанте нг/мл	ФВ в супернатанте ЕД/мл	VII фактор в супернатанте нг/мл	NT-proBNP в супернатанте пг/мл	дефензины в сыворотке пг/мл	дефензины в супернатанте пг/мл	СРБ в сыворотке мг/л	VII фактор в сыворотке нг/мл	NT- proBNP в сыворотке пг/мл	ИЛ 6 в сыворотке пг/мл	ИЛ 8 в сыворотке пг/мл
TP (True Positives)/FP (False Positives)	79,00	32,00	28,00	0,00	1,00	32,00	34,00	41,00	7,00	7,00	10,00	6,00	12,00
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	59,00	13,00	13,00	27,00	44,00	11,00	11,00	4,00	37,00	32,00	44,00	57,00	53,00
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	0,57	0,71	0,68	0,00	0,02	0,74	0,76	0,91	0,16	0,18	0,19	0,10	0,18
AUC (площадь под графиком)	0,70	0,73	0,86	0,78	0,66	0,73	0,92	0,86	0,87	0,86	0,74	0,82	0,65
Максимум sp+se	1,49	1,34	1,65	1,47	1,58	1,50	1,71	1,64	1,61	1,74	1,42	1,60	1,31
Значение показателя в максимуме	0,15	21,00	28,59	0,05	0,69	21,00	1700,00	210000,00	3,97	2,15	47,74	1,72	4,89
Чувствительность в максимуме	0,57	0,51	0,85	0,78	0,62	0,65	0,76	0,64	0,61	0,77	0,57	0,60	0,46
Специфичность в максимуме	0,91	0,75	0,80	0,69	0,96	0,85	0,92	1,00	1,00	0,97	0,85	1,00	0,85

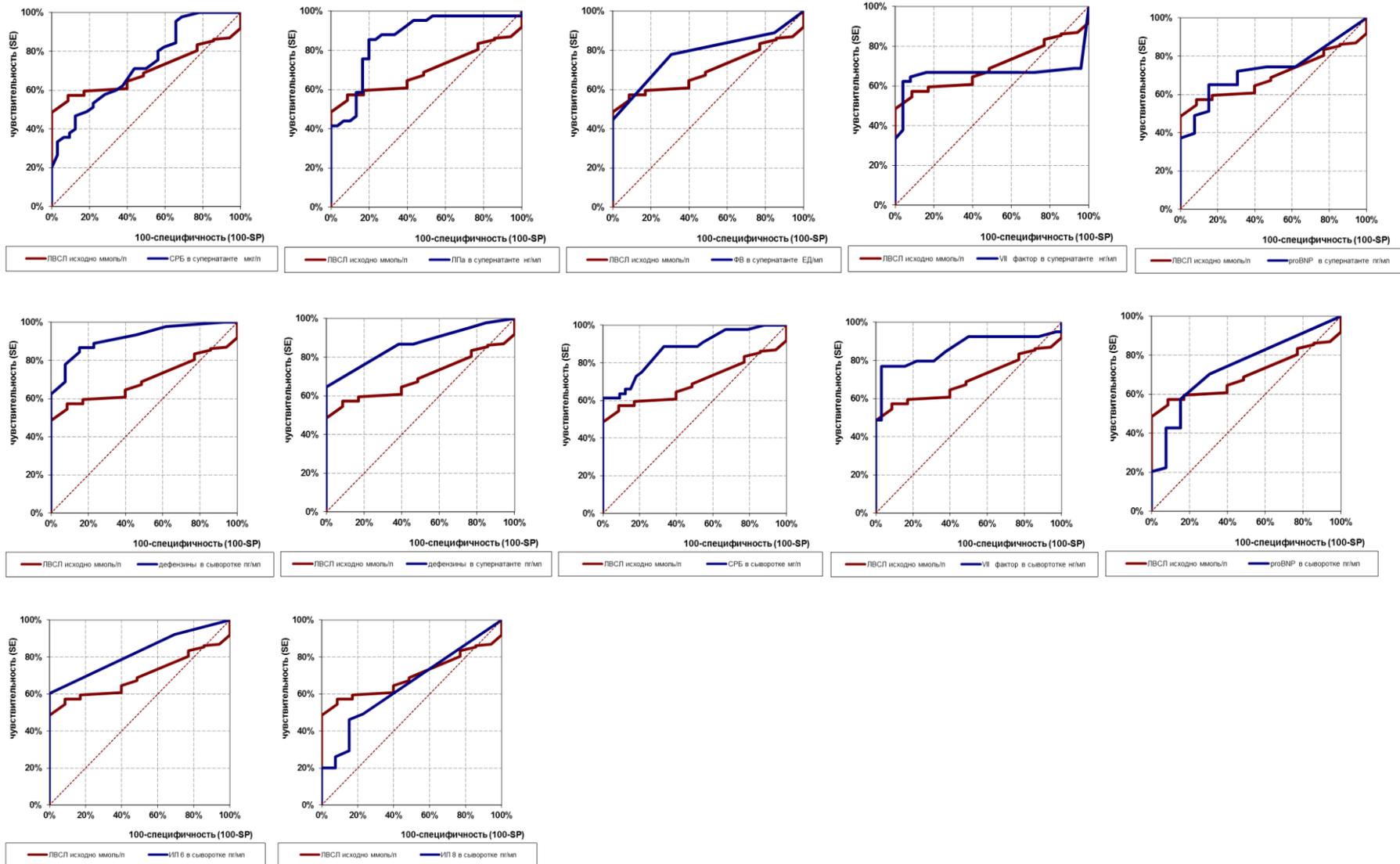


Диаграмма 42. ROC кривые, построенные по изучаемым сывороточным и лейкоцитарным факторам в группе больных с сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБ

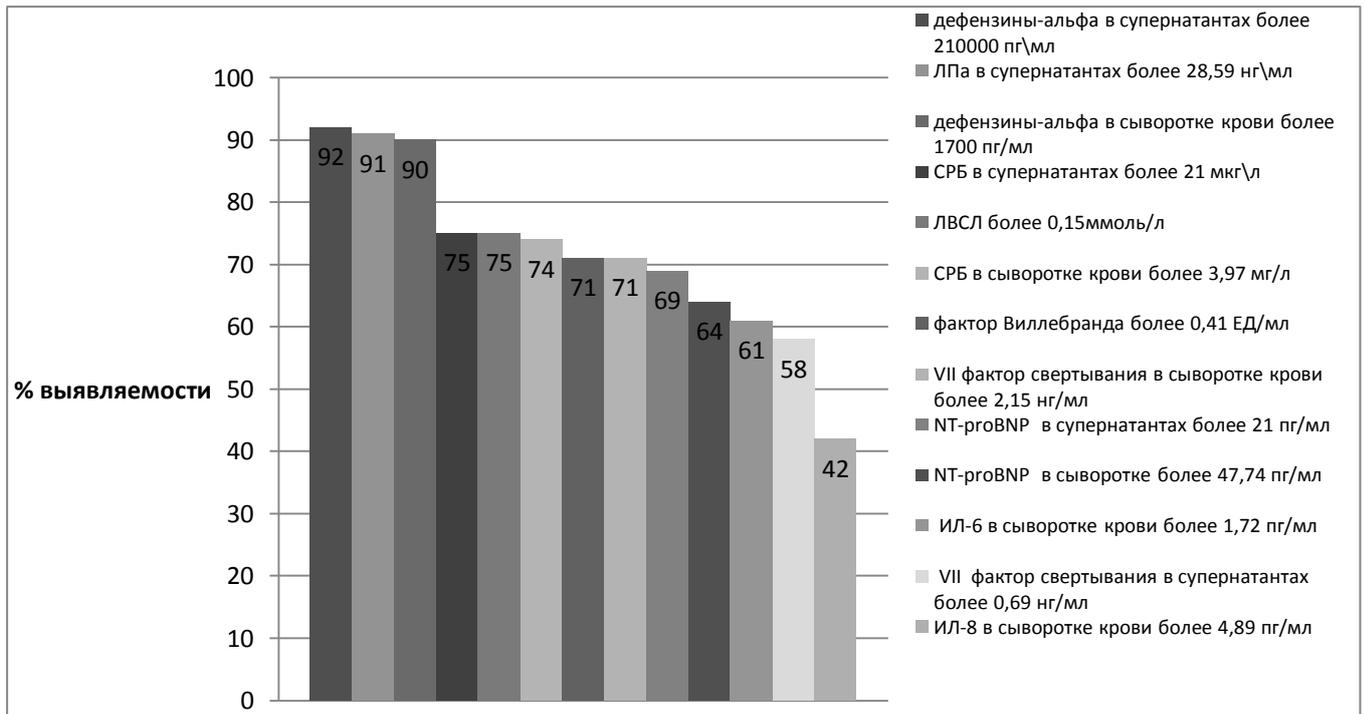


Диаграмма 43. Диаграмма Парето, построенная по выявляемости высокого содержания сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных с сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ

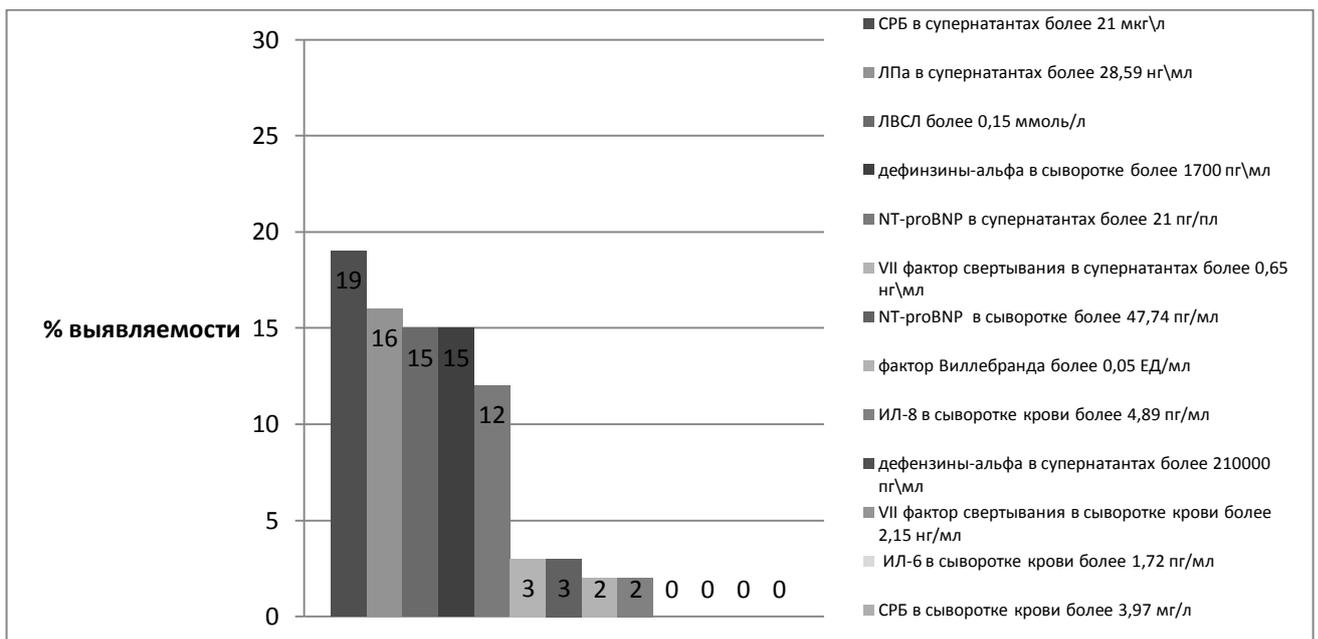


Диаграмма 44. Диаграмма Парето, построенная по выявляемости высокого содержания сывороточных и лейкоцитарных факторов у здоровых лиц

Как видно из диаграммы 44, выявляемость высоких значений исследуемых белковых факторов у здоровых лиц низкая.

С целью комплексной оценки белково-пептидного паттерна выбраны: концентрация в супернатантах СРБ, ЛПа, NT-proBNP, дефензинов, сывороточное

содержание дефензинов, СРБ и VIIф, а также величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ. Получено следующее уравнение регрессии: $y = -42,546 + 52,346 * x_1 + 0,02402 * x_2 + 0,452 * x_3 + 0,0175924 * x_4 + 0,00012186 * x_5 + 0,000013773 * x_6 + 1,17857 * x_7 + 3,48366 * x_8$, 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, x_6 - концентрация дефензинов в супернатантах, x_7 - сывороточная концентрация СРБ, x_8 - сывороточная концентрация VIIф.

В ходе ROC анализа проведена оценка разделительной эффективности данного комплексного подхода, характеризующего белково-пептидный паттерн, у больных сочетанным течением атеросклероза и здоровых лиц (таблица 77, диаграмма 45). Эта модель по показателю AUC имеет отличные свойства.

Таблица 77

Результаты ROC анализа разделительной эффективности комплексной оценки белково-пептидного паттерна больных с сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБ и здоровыми лицами

Показатель	Значение
TP (True Positives)/FP (False Positives)	39
FN (False Negatives)/TN (True Negatives)	0
Чувствительность (se)/Специфичность(sp)	100,00%
AUC (площадь под графиком)	1,00
Максимум $sp+se$	2,00
Значение показателя в максимуме	0,66
Чувствительность в максимуме	1,00
Специфичность в максимуме	1,00

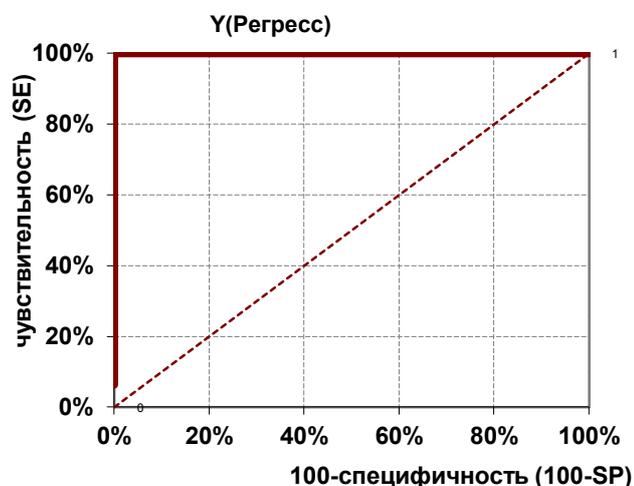


Диаграмма 45. ROC кривая, построенная по значению y у больных сочетанным атеросклерозом, ассоциированным с ГБ

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 приросту значения γ на 0,21%, концентрации ЛПа в лейкоцитарных супернатантах – на 0,46%, СРБ – на 0,01%, NT-proBNP – на 0,01%, дефензинов – на 0,08%, содержания в сыворотке дефензинов – на 0,01%, СРБ – на 0,06% и VIIф – на 0,15%.

Проведен сравнительный анализ различий изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных сочетанным течением атеросклероза, ИБС, ОААНК и ГБ (таблица 78). Наиболее существенные различия выявлены между группой больных с сочетанным атеросклерозом 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 отмечались более высокие концентрации 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.

Сравнительный анализ различных сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных сочетанным течением атеросклероза, ИБС, ОААНК и ГБ

Показатель	Группа больных сочетанным атеросклерозом Median (percentel 10/90)(n-38)	Группа больных ИБС Median (percentel 10/90) (n-66)	Достоверность различий, p-level	Группа больных ОААНК Median (percentel 10/90) (n-52)	Достоверность различий, p-level	Группа больных ГБ Median (percentel 10/90) (n-25)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,18 (0,12/0,25)	0,16 (0,09/0,25)	0,06	0,16 (0,09/0,24)	0,09	0,12(0,07/0,16)	0,04
СРБ в сыворотке, мг/л	5,99 (1,64/16,01)	6,99 (1,88/10,29)	0,1	4,82 (0,45/19,12)	0,1	4,12 (1,66/15,25)	0,5
СРБ в супернатанте, мкг/л	61,19 (10,75/127,10)	49,57 (16,25/106)	0,04	59,16 (9,15/189,3)	0,2	55,9 (18,3/130)	0,06
ЛПв в супернатанте, нг/мл	60,93 (33,51/61,50)	37,73 (23,55/55,25)	0,03	56,54 (41,09/61,7)	0,9	52,19(32,5/84,00)	0,03
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	2,69 (1,67/4,89)	5,59 (3,34/8,8)	0,06	0,96(0,27/1,53)	0,01	4,93(2,53/7,28)	0,9
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	1,75 (0,77/4,32)	2,38 (0,72/4,51)	0,2	0,2 (0/0,28)	0,008	2,37(0,78/4,74)	0,7
NT-proBNP в сыворотке, пг/мл	389,89 (88/2189)	499,89 (29/2154)	0,1	114,67 (0/561,89)	0,04	142,33 (10,00/151,50)	0,04
NT-proBNP в супернатанте, пг/мл	57,12(2,73/227,98)	157,12(23,73/257,64)	0,07	6,25(0/22,88)	0,01	138,14 (47,46/277,98)	0,08
Дефензины в сыворотке, пг/мл	2123,49(596,6/9528)	4389,94(2096,6/7932,0)	0,08	1779,8(419,6/4888)	0,09	6577,54 (3390,80/11296,00)	0,07
дефензины в супернатанте, пг/мл	667540(89720/862150)	656635(406000/921150)	0,1	147933(31260/200000)	0,02	518428,6 (109300,00/863000,00)	0,4
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	9,42 (0,8/56,47)	12,67 (1,3/52,64)	0,5	9,4 (8/10)	0,8	2,48 (0,11/7,30)	0,01
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	27,02 (0/125,5)	48,13 (0/154,25)	0,1	4,59 (0/17,7)	0,06	8,52 (0/27,3)	0,06

Резюме

Таким образом, у больных сочетанным течением атеросклероза в сыворотке крови достоверно выше, чем у здоровых лиц, содержание СРБ, NT-proBNP, VII фактора свертывания и дефензинов, а в супернатантах лейкоцитарных культур NT-proBNP, СРБ, ЛПа, VII фактора свертывания и дефензинов. Величина ЛВСЛ у больных сочетанным атеросклерозом также значительно превышала таковую у здоровых лиц группы сравнения.

Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация в сыворотке дефензинов, СРБ и VIIф, в супернатантах СРБ, ЛПа, NT-proBNP и дефензинов, а также величина ЛВСЛ), для создания математическая модели, описывающей белково-пептидный паттерн, характерный для больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированного с ГБ. 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 приросту значения γ на 0,21%, концентрации ЛПа в лейкоцитарных супернатантах – на 0,46%, СРБ – на 0,01%, NT-proBNP – на 0,01%, дефензинов – на 0,08%, содержания в сыворотке дефензинов – на 0,01%, СРБ – на 0,06% и VIIф – на 0,15%.

Выявлены различия содержания белков в супернатантах и сыворотке крови, а также величины ЛВСЛ между больными сочетанным течением атеросклероза и других групп наблюдения. Наиболее существенные отличия наблюдались между пациентами данной группы и больными ОААНК.

6.1. Результаты исследования в подгруппах больных сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с гипертонической болезнью, получавших и отказавшихся от приема статинов

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 «перемежающейся хромоты» в подгруппе пациентов, не принимавших статины (таблица 79).

Таблица 79

Оценка состояния больных с сочетанным течением атеросклероза, ассоциированным с ГБ, в зависимости от приема статинов

Клиническая оценка	статины +	статины -
без изменений	82%	74%
ухудшение	18 %	26%

В подгруппе пациентов, принимавших статины, в динамике закономерно наблюдалось достоверное снижение содержания ЛПНП и ТГ в сыворотке крови

(таблица 80). У пациентов, отказавшихся от приема статинов, значимых изменений показателей липидного спектра не наблюдалось.

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

Таблица 80

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

Показатель	исходно	В динамике	p
	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 81).

Таблица 81

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

Показатель	ЛВСЛ исходно, ммоль/л	ЛВСЛ в динамике, ммоль/л	p
	Me;10%;90%		
Статины +	0,16; 0,09; 0,24	0,12; 0,1; 0,16	0,034
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 и в сыворотке - ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО альфа (таблица 82).

У пациентов, получавших комплексную терапию с включением статинов, в динамике наблюдалось снижение содержания в лейкоцитарных супернатантах СРБ и дефензинов. Значимых различий по содержанию ЛПа и VII ф в супернатантах, а также изучаемых цитокинов в сыворотке крови не получено. Данный факт, по всей видимости, объясняется тем, что доля СРБ и дефензинов в белковой секреции нейтрофилов значимо больше, чем ЛПа и VII фактора. Факт снижения белковой продукции нейтрофилами под влиянием терапии статинами описан в работах Sugano R. (2005), van Oostrom A.J. (2006г) [242,262].

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 в супернатантах, мкг/л	46,94;10,40;91,20	34,35;4,30;78,85	0,040
	ЛПв в супернатантах, нг/мл	51,69;30,11;72,89	55,64;28,58;77,79	0,890
	VII фактор в супернатантах, нг/мл	2,05;0,53;3,80	2,92;0,55;6,4	0,940
	Дефензины в 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 в супернатантах, мкг/л	44,95;10,50;107,50	39,68;14,88;88,15	0,5640
	ЛПв в супернатантах, нг/мл	54,67;35,39;61,50	59,34;31,33;81,44	0,960
	VII фактор в супернатантах, нг/мл	1,02;0,1;1,4	1,03;0,2;1,4	0,940
	Дефензины в 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

Резюме

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

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Актуальность исследования обусловлена широкой распространенностью заболеваний, ассоциированных с атеросклерозом. Можно говорить о наличии пандемии данной патологии в развитых странах мира, в том числе и в Российской Федерации. Являясь основной причиной летальности и инвалидизации населения, ассоциированные с атеросклерозом заболевания наносят огромный экономический вред [42,83,94].

Понимание сущности происходящих в ходе атерогенеза процессов позволит разработать эффективные методы профилактики, диагностики и лечения этого заболевания. Значительный вклад в понимание причин развития атеросклероза внесли инфильтрационная, реакция на повреждение, воспалительные и другие теории. [209].

Анализ научной литературы показал, что атеросклероз является многофакторным патологическим процессом, в котором участвует кооперация различных клеток – эндотелиальных, дендритических, гладкомышечных, тромбоцитов, лейкоцитов и ряда других [187]. Однако, до сих пор мало изучена роль в процессах атерогенеза самой многочисленной субпопуляции лейкоцитов - нейтрофилов [33].

Органы мишени атеросклероза - артерии эластического и мышечного типов, включая магистральные ветви грудной аорты, мозговые, коронарные, почечные артерии, артерии нижних конечностей. ИБС и ОААНК – две нозологические единицы, которые имеют много общего, в том числе и факторы риска. Однако, несмотря на схожесть механизмов развития, у этих заболеваний отмечена определенная специфика атерогенеза, обусловленная рядом факторов. Во-первых, различается калибр пораженных артерий и соответственно гемодинамическая нагрузка, оказываемая на стенку сосуда. Во-вторых, отличаются собственно подвергающиеся ишемизации органы, что, безусловно, должно сказываться на

течении заболеваний. Так в случае ИБС более заметно влияние нейрогуморальных изменений, возникающих вследствие формирования ХСН [3,20,167], а поражение нижних конечностей, часто сопровождается некрозом тканей, что потенцирует провоспалительные изменения [57].

Следует отметить, что в реальной клинической практике изолированное поражение коронарного русла и артерий нижних конечностей встречается не так часто. Еще одной особенностью является то, что процесс формирования атеросклеротического поражения начинается задолго до появления клинических проявлений ишемии органов [58,237]. Из сказанного выше следует актуальность поиска «новых» и уточнение значимости уже известных маркеров ранних стадий атерогенеза, а также оценки специфики паттерна факторов в различных клинических ситуациях.

Целью работы было на основе структурно-функционального изучения миокарда и артериальной стенки, новых лейкоцитарных и ряда сывороточных маркеров выявить факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных атеросклерозом различной локализации. Для достижения поставленной цели решались следующие исследовательские задачи.

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.

Перечисленные выше цель и задачи обусловили дизайн исследования, который предусматривал изучение групп больных ИБС и ОААНК, пациентов с сочетанным течением атеросклероза, а также пациентов с ГБ без клинических и инструментальных проявлений атеросклероза. Последняя группа была выбрана как модель доклинического атеросклеротического поражения артерий. Подобный дизайн исследования позволял оценить особенности атерогенеза при различной локализации, стадии и распространенности этого процесса.

На этапе планирования исследования по показателю ЛВСЛ определен объем выборки для достижения мощности 80%. В данном случае показатель ЛВСЛ выбран исходя из того, что имелись предыдущие исследования, определившие его средние значения и дисперсию у больных атеросклерозом [1,2,14].

Для достижения цели исследования потребовалась разработка нового метода оценки белокпродуцирующей функции нейтрофилов *in vitro*, так как до этого в лейкоцитарных супернатантах в основном изучалась содержание холестерина (ЛВСЛ) [9].

Постановка задач исследования, посвященных изучению функции нейтрофилов у больных атеросклерозом различной локализации и здоровых лиц, позволила оценить особенности белково-пептидного паттерна в этих группах,

определить его взаимосвязь с инструментальными и другими лабораторными данными.

Безусловный интерес представлял вопрос изучения влияния на лейкоцитарные факторы терапии статинами. Реализация этой задачи стала возможна при проспективном наблюдении, в ходе которого была выделена группа пациентов, самостоятельно отказавшихся и/или не принимавших статины в непрерывном режиме.

В нашем исследовании в группах больных атеросклерозом отмечался нейтрофильный лейкоцитоз (у больных ИБС - 3,85 (3,23;7,08) 10^9 в л; у больных ОААНК – 4,82 (3,13;8,26) 10^9 в л, у больных сочетанным течением атеросклероза – 4,69 (3,14;7,16) 10^9 в л). Не вызывает сомнения, что в процессе формирования атеросклеротического поражения неперенными участниками являются лейкоциты, мигрирующие из кровотока в сосудистую стенку. Выполнено несколько мета-анализов, показавших независимую предсказующую ценность определения количества различных типов лейкоцитов в прогнозировании риска появления сосудистых ишемических событий, связанных с атеросклерозом [55,274]. Ряд исследований показал, что для реализации своей активности клетки, в том числе и лейкоциты, должны находиться в тесном контакте, который достигается в условиях воспалительной инфильтрации тканей [199].

Принцип тесного межклеточного контакта послужил основой для разработки методики определения ЛВСЛ А.В. Туевым, В.Ю. Мишлановым [22]. Данная методика послужила прототипом для разработки метода определения белоксинтезирующей способности лейкоцитов *in vitro*, разработанного для решения задач нашего исследования.

В предшествующих исследованиях показано клиническое значение ЛВСЛ [1,2,5], в частности, получены данные, что увеличение ЛВСЛ является предиктором развития атеросклероза у больных АГ и нестабильного течения ИБС [14]. Установлена прямая умеренной силы взаимосвязь тяжести ХСН, функционального класса стенокардии и величины ЛВСЛ [2].

В нашем исследовании у здоровых лиц значения ЛВСЛ ($0,13 \pm 0,02$ ммоль/л) соответствовали таковым в предыдущих исследованиях ($0,12 \pm 0,05$ ммоль/л) [14]. Изучение ЛВСЛ у пациентов с ГБ без клинических проявлений атеросклероза показало сопоставимые с группой здоровых значения (соответственно $0,12 \pm 0,03$ ммоль/л, $0,13 \pm 0,02$ ммоль/л, $p=0,75$). В то же время, величина ЛВСЛ у здоровых и пациентов с ГБ достоверно отличалась от среднего значения ЛВСЛ у больных ИБС ($0,17 \pm 0,06$ ммоль/л, $p=0,01$), ОААНК ($0,16 \pm 0,06$ ммоль/л, $p=0,04$) и сочетанным атеросклерозом ($0,18 \pm 0,07$ ммоль/л, $p=0,03$). Особенно высокие значения этого показателя отмечены у больных ИБС с нестабильной стенокардией ($0,21 \pm 0,02$ ммоль/л, $p=0,02$). Данные результаты свидетельствуют о связи этого показателя с активностью, тяжестью и распространенностью атеросклеротического поражения. Для понимания сущности ЛВСЛ следует еще раз подчеркнуть, что в результате пробоподготовки в изучаемых культурах клеток до 80% составляют нейтрофильные лейкоциты. Остальные клетки представлены лимфоцитами и моноцитами. Показано, что величина ЛВСЛ коррелировала с процентом выживших в процессе культивирования нейтрофилов ($R=0,49$, $p=0,02$) [22]. Таким образом, величина ЛВСЛ в основном определяется функциональной активностью нейтрофилов.

Завершающим этапом методики изучения ЛВСЛ является определение концентрации холестерина в трехсуточных лейкоцитарных супернатантах. Следует отметить, что холестерин в супернатантах находится не в свободном виде, а в составе белково-липидных комплексов. В атеросклеротических бляшках, различные типы клеток, в том числе лейкоциты могут генерировать микрочастицы (MPs), в состав оболочек которых входят белково-липидные структуры. Эти везикулы выделяются в межклеточное пространство путем прямого отпочковывания от плазматической мембраны клеток. У здоровых лиц лейкоцит-производные везикулы (LMPs) представляют собой незначительную часть (<10%) от общей массы MPs в крови [196]. Плазменные уровни LMPs значительно увеличиваются у пациентов с сердечно-сосудистыми и метаболическими расстройствами, в том числе при атеросклерозе, артериальной

гипертензии и сахарном диабете [119]. Эти везикулы могут взаимодействовать с производящими их клетками и усиливать тем самым воспаление, апоптоз и высвобождение биологически активных веществ [208]. Ранее считалось, что макрофаги и «пенистые» клетки генерируют LMPs в ходе апоптоза. Однако недавние исследования показали, что живые лейкоциты выделяют LMPs после активации различными раздражителями [208]. Можно предположить, что определяемый в ходе методики изучения ЛВСЛ холестерин входит в состав выделяемых лейкоцитами микровезикул.

В последние годы по новому оценивается значение нейтрофилов в процессах формирования атеросклеротического поражения. Нейтрофилы являются первыми лейкоцитами, проникающими в воспаленные ткани. Однако продолжительность жизни нейтрофилов в сосудистой стенке редко превышает 24 часа. В этой связи при проведении рутинных гистологических исследований эти клетки редко обнаруживались в человеческих атеромах. Тем не менее, ранний приток нейтрофилов был описан в нескольких экспериментальных моделях повреждения сосудов [33,43,125]. Исследование *Zernecke et al* показало, что лечение с использованием антинейтрофильных антител мышей, дефицитных по $\alpha\text{M}\beta\text{2}$, нарушало формирование бляшек в корне аорты, демонстрируя, что нейтрофилы стимулируют атерогенез в данной животной модели. Кроме того, *Zernecke et al.* установлено, что нейтрофильное истощение на фоне проводимой терапии препятствовало дестабилизации течения атеросклероза после хронического блокады CXCR4 [282].

В целом, вопреки давней и широко распространенной мысли, что роль нейтрофилов малоактуальна в рамках атерогенеза, доказательства из биологии нейтрофилов и проведенные исследования воспалительных и инфекционных заболеваний наводят на мысль, что эти клетки вносят важный вклад в патогенез атеросклероза и его осложнений, поскольку они способны воспринимать сигналы из внешней среды для выполнения программ, которые играют важную роль в деле координации воспалительного ответа и его разрешения. Центральным элементом этих программ является способность нейтрофилов тесно общаться с соседними

иммунными и неиммунными клетками (такими как моноциты/макрофаги, Т-лимфоциты, дендритные клетки, эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки) через высвобождение различных медиаторов и прямых контактных факторов [35].

Для подтверждения гипотезы об активной роли лейкоцитов в формировании величины ЛВСЛ на лейкоцитарных культурах больных ИБС поставлены эксперименты с введением в клеточную среду ФНО-альфа и ИЛ-6 [5,14]. Известно, что активность лейкоцитов находится под контролем цитокинов, так, ранее опубликованы данные о стимулирующем влиянии ИЛ-1 и ИЛ-2 на ЛВСЛ у больных ИБС [14]. Механизм активирующего влияния ФНО- α на нейтрофилы (*in vitro*) может быть обусловлен его прямым стимулирующим действием. В настоящее время известны два типа рецепторов ФНО-альфа. Рецепторы I типа с молекулярной массой 55 кД экспрессируются почти всеми типами клеток и опосредуют главным образом воспалительные и цитотоксические эффекты ФНО, рецепторы II типа с молекулярной массой 75 кД – в основном клетками крови, в том числе нейтрофилами. Под влиянием различных стимулов, в том числе ФНО-альфа, ядерный фактор транскрипции (NF κ - β) мигрирует из цитоплазмы в ядро, где связывается со специфическим участком ДНК и активирует транскрипцию «воспалительных» генов [111]. Очевидно, таким образом ФНО-альфа может стимулировать ЛВСЛ у больных ИБС.

Рецепторов к ИЛ-6 на нейтрофилах не обнаружено. Стимулирующее влияние этого цитокина на ЛВСЛ (*in vitro*), по всей видимости, опосредовано через лимфоциты, присутствующие в небольшом количестве в лейкоцитарных культурах, которые могут выделять целый ряд цитокинов, непосредственно активирующих нейтрофилы [24].

Клиническое значение величины ЛВСЛ подтверждено проведением корреляционного анализа в группах больных ИБС, ОААНК и ГБ. Так среди больных ИБС выявлена прямая взаимосвязь этого показателя с маркерами тяжести атеросклеротического поражения – процентом сужения коронарных артерий по данным ангиографии ($R=0,7, p=0,04$), а в группе больных ОААНК

обратная взаимосвязь со значением ЛПИ ($R=-0,48, p=0,001$).

В группе больных ИБС продемонстрирована взаимозависимость ЛВСЛ с клиническими, лабораторными и инструментальными маркерами тяжести ХСН. Так у пациентов с ИБС, которым проводилось коронарное шунтирование, установлена прямая взаимосвязь этого показателя с ФК ХСН, объективизированным тестом 6-минутной ходьбы с on-line мониторингом ЧСС ($R=0,4, p=0,02$). Во всех группах больных ИБС величина ЛВСЛ прямо коррелировала с размером левых отделов сердца – КДО ($R=0,34, p=0,02$), КСО ($R=0,34, p=0,03$), линейным размером ЛП ($R=0,8, p=0,03$), толщиной МЖП (группа больных ИБС нестабильного течения ($R=0,8, p=0,006$) и обратно - с ФВ ЛЖ ($R=-0,35, p=0,008$).

В объединенной группе больных ИБС установлена прямая связь значения ЛВСЛ и тяжести комплексных морфо-функциональных изменений, характеризующих дисфункцию сердца по данным ультразвукового исследования (бессимптомная дисфункция сердца, адаптивное и дезадаптивное ремоделирование по критериям ОССН[11]) ($R=0,31, p=0,01$). Еще одним подтверждением взаимосвязи величины ЛВСЛ и тяжести ХСН является обнаруженная нами положительная корреляция между значением ЛВСЛ и сывороточным содержанием NT-proBNP ($R=0,54, p=0,02$). Взаимосвязь между ЛВСЛ и маркерами ХСН можно объяснить характерной для нее гиперцитокинемией, активизирующей нейтрофилы и тем самым увеличивающей ЛВСЛ [3,20,167].

В нашем исследовании показана прямая взаимосвязь величины ЛВСЛ и содержания дефензинов-альфа (1-3) и NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах. Трактовка этого факта неоднозначна. С одной стороны, можно говорить об однонаправленности процессов синтеза этих белковых факторов и способности лейкоцитов высвободить белково-липидные комплексы. С другой стороны дефензины и BNP обладают способностью образовывать связи с холестерином и могут быть структурными компонентами белково-липидных

комплексов, маркируемых величиной ЛВСЛ. Способность нейтрофилов синтезировать дефензины альфа 1-3 типов хорошо известна [101,180].

Обнаружены три типа натрийуретических пептидов (А, В и С) Среди них только CNP, синтезируемый в основном эндотелием, в небольшом количестве выделяется другими клетками, в том числе и лейкоцитами [127]. В этой связи факт обнаружения методом ИФА в лейкоцитарных супернатантах NT-proBNP также можно объяснить продукцией этого пептида лейкоцитами больных ИБС. Подтверждением этому являются обнаруженные нами различия в содержании этого пептида в супернатантах здоровых лиц и пациентов с ИБС и ГБ. Так концентрация NT-proBNP в супернатантах больных ИБС составила - $157,12 \pm 82,58$ пг/мл, а у здоровых - $39,38 \pm 84,65$ пг/мл ($p=0,01$). Проведенное экспериментальное исследование с культурами лейкоцитов больных ХСН показало факт увеличения концентрации этого белка в лейкоцитарных лизатах после трехсуточного культивирования. Подобная динамика содержания белка может быть объяснена вероятной индукцией образования proBNP нейтрофилами, предопределенной предшествующей историей их функционирования в условиях специфической нейрогуморальной стимуляции на фоне ХСН, при тесном межклеточном контакте.

Значимая корреляция получена между значениями ЛВСЛ у больных ИБС и сывороточным содержанием дефензинов, отражающим неспецифический противомикробный ответ в рамках системы врожденного иммунитета. Взаимосвязь этих процессов объясняется типоспецифическим реагированием лейкоцитов в ответ на стимуляцию Толл-подобных рецепторов определенными структурными группами, имеющимися как в стенках микроорганизмов, так и модифицированных липопропротеидах [37,47,225].

Многие авторы считают, что роль нейтрофилов может быть лучше понята при изучении их биохимических «следов» в очагах воспаления и в отдаленных от них регионах [179].

В связи с этим нами исследованы белки, которые разносторонне характеризуют процессы, происходящие в рамках атерогенеза. Это факторы

относящиеся к системе врожденного иммунитета (СРБ, дефензины-альфа), провоспалительные цитокины (ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-альфа), тромбофилические факторы (ФВ, VIIф), показатели, отражающие повреждение клетки (БСЖК, NT-proBNP) и ЛПа, характеризующий не только дислипидемию, но и характер репаративных и тромбофилических процессов. Объединяющее свойство изученных белковых факторов - способность образовывать связи с холестерином, то есть быть компонентом белково-липидных комплексов.

Нам представлялось интересным изучить эти факторы не только в сыворотке крови, но и в культурах выделенных из венозной крови лейкоцитов. Для этой цели разработан метод определения концентрации изучаемых белков посредством ИФА в супернатантах трехсуточных лейкоцитарных культур [9].

В предыдущих исследованиях в супернатантах лейкоцитарных культур больных атеротромботическим подтипом ишемического инсульта обнаруживались апопротеин а и СРБ [1]. Однако данные носили характер единичных наблюдений. В нашем диссертационном исследовании проведен анализ содержания белковых факторов в лейкоцитарных супернатантах в различных клинических группах.

Анализ полученных результатов исследования показал следующее. У больных ГБ и ОААНК сывороточное содержание высокочувствительного СРБ, ЛПа и дефензинов превышало верхнюю границу нормативного диапазона, а у больных ИБС, помимо этого, установлено наличие высокой сывороточной концентрации NT-proBNP, ИЛ-6 и ИЛ-8. Следует отметить, что содержание этих биомаркеров в группе здоровых лиц находилось в нормативном диапазоне, что свидетельствовало о правильности ее формирования.

Проведенное сравнение изучаемых показателей со значениями у здоровых лиц выявило следующие закономерности. У больных ГБ, несмотря на превышение нормативного диапазона среднего значения содержания СРБ ($4,1 \pm 5,0$ мкг/л) в сыворотке крови, сопоставление его с величиной у здоровых ($1,3 \pm 0,9$) не выявило статистически значимых различий в виду большой дисперсии. Однако были отмечены значимо более высокие концентрации ЛПа и дефензинов в

сыворотке крови. Высокая концентрация ЛПА у данной категории пациентов, по всей видимости, связана с конституционально более высокой скоростью его синтеза. Подобное утверждение следует из анализа данных научной литературы, указывающих на то, что индивидуальный уровень ЛПА мало изменчив в течение жизни и зависит от генетически определенного повторения структурных кринглов, определяющих размер апобелка а [132,183,225]. Напротив, генетически детерминированная концентрация дефензинов-альфа, определяется также индукцией его синтеза и высвобождения нейтрофилами различных провоспалительных факторов. Таким образом, высокое содержание дефензинов в сыворотке больных ГБ свидетельствует о наличии субклинической воспалительной направленности происходящих у них патогенетических процессов.

Исследование содержания изучаемых биомаркеров в лейкоцитарных супернатантах выявило значимо более высокое содержание дефензинов и NT-proBNP у пациентов с ГБ. Факт высокого содержания в лейкоцитарных супернатантах дефензинов-альфа и NT-proBNP объясняется по нашему мнению активностью их образования и высвобождения лейкоцитами пациентов. Рассуждения, обосновывающие возможность синтеза лейкоцитами этих белков, приводятся выше.

Проведенный статистический анализ различий изучаемых биомаркеров у больных ИБС и здоровых лиц выявил, что сывороточное содержание СРБ ($6,69 \pm 3,42$, мг/л, $p=0,02$), ЛПА ($42,65 \pm 25,48$, нг/мл, $p=0,01$), NT-proBNP ($499,89 \pm 164,84$, пг/мл, $p=0,03$), дефензинов-альфа (4389 ± 2367 пг/мл, $p=0,04$), VПф ($5,59 \pm 2,17$, нг/мл, $p=0,02$), а также ИЛ-6 ($12,67 \pm 18,06$, пг/мл, $p=0,03$) и ИЛ-8 ($48,13 \pm 70,02$, пг/мл, $p=0,01$) выше у пациентов с клинически выраженным коронарным атеросклерозом.

Факт наличия высокой концентрации СРБ в сыворотке крови у больных ИБС хорошо известен по данным других работ [175,214]. Высокое содержание в сыворотке крови больных ИБС СРБ следует рассматривать, как маркер атерогенеза. Считают, что патогенетическое значение СРБ, как и большинства

цитокинов, реализуется посредством активации NFκB [160], который является важным фактором транскрипции и участвует в активации специфических провоспалительных генов и в механизмах апоптоза клетки. Установлено, что СРБ причастен к уменьшению активности эндотелиальной синтазы оксида азота [71], увеличению окисления ЛПНП. В целом СРБ оказывает отрицательное влияние на функцию эндотелия [139] и повышает ангиотензин II-индуцированные провоспалительные эффекты [139]. Также показано снижение количества и функциональной активности эндотелиальных прогениторных клеток путем стимулирования апоптоза и снижения их миграции. Выявлено, что СРБ обладает протромботическим потенциалом за счет стимуляции тканевого фактора, высвобождаемого из мононуклеарных эндотелиальных клеток и ГМК, а также усиливает активность PAI-1 с сопутствующим ингибированием тканевого типа активатора плазминогена (t-РА). В результате этого снижается активность фибринолиза [36]. СРБ увеличивает синтез матричных металлопротеиназ (ММП) с последовательным увеличением деградации коллагена и числа моноцитов-макрофагов [71,155].

Характерная для обследованных пациентов с ИБС высокая концентрация ЛПА в сыворотке крови, как и в случае с больными ГБ, объясняется конституционально высокой скоростью его синтеза и рассматривается как проатерогенный и тромбофилический фактор. Известно, что апо(а), входящий в состав ЛПА, является уникальным белком высоко гомологичным плазминогену, но лишенным его протеазной активности. Конкурентное ингибирование связывания плазминогена ЛПА, возможно, следует рассматривать, как эволюционно сформированный механизм гемостаза и репарации на участках артериального повреждения [183]. Способствуя ослаблению фибринолиза, ЛПА увеличивает тем самым тромбообразование и доставку холестерина. ЛП(а) обладает прямым проатерогенным действием, так как, проникая в экстрацеллюлярный матрикс интимы, он участвует в активации моноцитов, опосредованной интегринами, инициируя, таким образом, локальное воспаление сосудистой стенки [250]. Примечательно, что фосфолипиды, входящие в состав

ЛП(а), способны подвергаться окислению подобно фосфолипидам ЛПНП, что по результатам экспериментальных исследований значительно усиливает проатерогенные эффекты ЛП(а) [280].

Выявленную высокую концентрацию дефензинов в сыворотке крови у больных ИБС также следует рассматривать как значимый маркер активности атерогенеза. Это подтверждают данные исследований, посвященных изучению роли антимикробных протеинов в атерогенезе. Обнаружено, что дефензины альфа 1-4 типов влияют на три независимых хорошо известных фактора риска, участвующих в развитии атеросклероза. Во-первых, они стимулируют связывание ЛПНП и ЛП(а) клетками и матриксом сосудистой стенки [91]. Дефензины увеличивают тропность ЛП(а) к эндотелию примерно в четыре раза, а к гладкомышечным клеткам примерно в шесть раз. Эти исследования показывают, что дефензины, освобожденные из активированных или стареющих нейтрофилов, могут способствовать локализации и устойчивости ЛП(а) в человеческих сосудах и, таким образом, предрасполагают к развитию атеросклероза [113]. При этом они стимулируют связывание ЛПНП, но препятствуют их деградации. Во-вторых, альфа-дефензины тормозят фибринолиз, опосредованный тканевым плазминогеном [180], что способствует развитию атеросклеротических поражений [180]. В третьих, альфа-дефензины стимулируют сокращение непораженных атеросклерозом кровеносных сосудов, что также способствует патогенезу ИБС [180].

Подтверждением связи между содержанием дефензинов в крови и развитием атеросклероза является то, что они найдены в избытке вокруг интимальных и медиальных ГМК в атеросклеротических поражениях сонных и коронарных артерий [113,114,180]. Это наблюдается даже на ранних этапах развития атеросклероза. В нашем исследовании у больных с нестабильной стенокардией выявлены высокие сывороточные концентрации дефензинов, по данному показателю установлена «точка разделения» (4000 пг/мл) между больными ИБС с нестабильной и стабильной стенокардией.

Установленная в исследовании высокая концентрация NT-proBNP в сыворотке крови пациентов с ИБС объясняется имеющейся у них ХСН и непосредственным действием ишемии миокарда. Показано, что уровни натрийуретических пептидов могут увеличиваться в несколько раз у больных ИБС, вероятно, вследствие компенсационного механизма. Во время ишемии миокарда эти пептиды играют защитную роль, препятствуя развитию эндотелиальной дисфункции и опосредованному воспалением ущербу, способствуя расширению эпикардальных сосудов [34]. В высокой концентрации они могут также тормозить пролиферацию фибробластов, секрецию коллагена и вызывать апоптоз миоцитов, предотвращая процесс ремоделирования сердца после эпизода ишемии миокарда [174]. При возрастании преднагрузки на сердце стимулируется секреция BNP, которые, в свою очередь, уменьшают давление наполнения сердца и улучшают сердечную деятельность. Имеются данные, что эти пептиды тормозят секрецию катехоламинов, эндотелина-1, ренина, ангиотензина II и альдостерона, которые способствуют ремоделированию сердца и развитию в миокарде соединительной ткани [127]. Существуют свидетельства того, что системный воспалительный ответ повышает секрецию натрийуретических пептидов. Доказательства в поддержку этой гипотезы были получены в экспериментах *in vitro*. Липополисахариды и провоспалительные цитокины стимулировали экспрессию мРНК BNP в культивируемых миоцитах крыс [213].

В нашем исследовании получены данные о значимо более высокой концентрации VII фактора в сыворотке крови у больных ИБС по сравнению со здоровыми лицами. Значение VII фактора свертывания, как тромбофилического фактора хорошо известно. VII фактор рассматривается в качестве независимого маркера риска при различных атеросклеротических заболеваниях [211]. Так повышение активности VII фактора свертываемости связывают с высоким риском ИБС, особенно ее фатальным исходом. Представляют интерес данные о том, что в месте разрыва бляшки образуются лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты, активирующие воспаление, что ведет к увеличению концентрации лиганда CD40,

ИЛ-6, тканевого фактора и VII фактора свертывания в пораженной коронарной артерии по сравнению с их уровнем в периферической крови [244]. Эти данные демонстрируют взаимосвязь между воспалением и тромботическим состоянием в месте разрыва бляшки. Интересны результаты исследования, доказывающего связь факторов коагуляции с воспалением, когда назначение рекомбинантного фактора VII здоровым людям вызывало трех - четырехкратное повышение плазменных уровней ИЛ-6 и ИЛ-8 [43,48,68].

В нашем исследовании подтверждены данные других авторов о характерной для больных ИБС провоспалительной гиперцитокинемии. Так сравнение результатов исследования содержания в сыворотке крови ИЛ-6 и ИЛ-8 показало значимо более высокие концентрации этих цитокинов у больных ИБС [248]. Установлены взаимосвязи сывороточных концентраций ИЛ-6, СРБ, дефензинов, NT-proBNP, что свидетельствует об общности процессов субклинического воспаления и функциональных изменений, происходящих в рамках формирования сердечно-сосудистого континуума.

В нашей работе не установлено значимой роли БСЖК в атерогенезе, что подтверждает низкая разделительная эффективность этого показателя у больных доклиническим и клинически манифестным атеросклерозом. Отсутствует корреляция между содержанием этого фактора в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах с маркерами тяжести атеросклеротического поражения.

Представляют интерес результаты исследования содержания биомаркеров в лейкоцитарных супернатантах. Так в нашем исследовании установлено, что в лейкоцитарных супернатантах больных ИБС оказались значимо более высокие концентрации СРБ, ЛПА, дефензинов-альфа, VII фактора свертывания, ФВ и NT-proBNP. Патогенетическая роль СРБ, ЛПА, дефензинов-альфа, NT-proBNP и VIIф обсуждена ранее. Роль ФВ в атерогенезе установлена в исследованиях на животных с использованием свиней и мышей [235]. Дефицитные по этому фактору животные имели менее выраженное атеросклеротическое поражение сосудов по сравнению с диким типом. В большинстве проспективных когортных

исследований и мета-анализе, включающем более 6500 больных показано, что высокие значения этого фактора ассоциируются с увеличением риска инфаркта миокарда [234].

Высокая концентрация обсуждаемых белковых факторов в лейкоцитарных супернатантах по нашему мнению может быть связана с высвобождением их лейкоцитами. Возможность синтеза лейкоцитами дефензинов и СРБ хорошо известна [50].

Касательно возможности высвобождения лейкоцитами VIIф имеются косвенные данные, полученные в исследовании содержания этого фактора непосредственно в коронарной артерии, где у больных с острым коронарным синдромом выявлено более высокое его содержание, чем в периферической крови [153].

Прямых данных о возможности синтеза BNP лейкоцитами в литературных источниках нет. Однако имеются исследования, указывающие на связь системного воспаления и концентрации в крови NT-proBNP [212,213]. Кроме того, известно, что другой подтип этих пептидов - CNP синтезируется в небольших количествах лейкоцитами [127]. Таким образом, эти данные не исключают возможности образования и высвобождения лейкоцитами BNP. Косвенно свидетельствует об этом результат проведенного нами экспериментального исследования, изложенного выше.

Убедительных данных о возможности синтеза лейкоцитами ФВ и ЛПа в литературных источниках не найдено. Однако имеются сведения о способности нейтрофилов обмениваться с другими клетками цитоплазматическими компартментами, содержащими разнообразные белковые факторы [33]. Концентрация обнаруживаемого в супернатантах ЛПа иногда превышает его сывороточное содержание, что косвенно свидетельствует об образовании этого фактора лейкоцитами *de novo*.

Следует повторить высказанную ранее мысль о том, что изучение белковых факторов, образующихся лейкоцитами, наиболее информативно в условиях, приближенных к тем, которые существуют в тканевом лейкоцитарном

инfiltrате. В этой связи использованный методологический подход с культивированием лейкоцитов в условиях тесного межклеточного контакта и метаболического стресса, на наш взгляд, оптимален, так как только при достижении тесного взаимодействия друг с другом лейкоциты способны реализовать большинство заложенных в них программ белковой продукции [199].

У пациентов с ОААНК, также как и у больных ИБС, сывороточные концентрации СРБ, ЛПа и дефензинов превышали нормативные значения, что свидетельствует о провоспалительной и проатерогенной направленности патогенетических процессов. Установлено, что в лейкоцитарных супернатантах обнаруживались значимо более высокие концентрации СРБ ($53,64 \pm 55,35$, мкг/л, $p=0,01$) и ЛПа ($56,54 \pm 9,24$, нг/мл, $p=0,02$), чем у пациентов с ИБС и здоровых, а в сыворотке крови содержание дефензинов (1779 ± 1920 , пг/мл, $p=0,04$) выше, чем у здоровых лиц. В нашем исследовании показано, что у больных ОААНК, имеющих ультразвуковые признаки «нестабильности» атеросклеротической бляшки, отмечаются более высокие концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах, чем у пациентов со «стабильными» структурными изменениями сосудов. По данному показателю установлена «точка разделения» между пациентами с «нестабильными» и «стабильными» бляшками равная 70 мкг/л.

Анализ различий изучаемых биомаркеров в группах больных ИБС и ОААНК показал, что у больных ИБС в сыворотке выше содержание дефензинов (4389 ± 2367 , пг/мл, $p=0,03$), VII фактора свертывания ($5,59 \pm 2,17$, нг/мл, $p=0,03$), в супернатантах - VIIф ($2,38 \pm 1,76$, нг/мл, $p=0,02$), ФВ ($1,1 \pm 0,22$, ЕД/мл, $p=0,01$), дефензинов (656635 ± 184329 , пг/мл, $p=0,03$) и NT-proBNP ($157,12 \pm 82,58$, пг/мл, $p=0,02$), в то время как у больных ОААНК в супернатантах оказалась выше концентрация СРБ и ЛПа (см. выше). По концентрации ЛПа в супернатантах установлена «точка разделения» между данными заболеваниями равная 58,68 нг/мл. Проведенный математический анализ с использованием метода логистической регрессии выявил, что наибольшую значимость в разделении этих клинических форм атеросклероза имеют значения концентрации в лейкоцитарных супернатантах ЛПа и дефензинов.

Данные особенности концентраций изучаемых биомаркеров, по всей видимости, объясняются тем, что у больных ИБС дополнительный вклад вносят гуморальные изменения, формирующиеся в процессе развития ХСН, облигатно сопутствующей коронарному атеросклерозу [3]. Более высокое содержание в супернатантах СРБ и ЛПа у больных ОААНК свидетельствует, по нашему мнению, о большей провоспалительной и репаративной направленности патогенетических процессов, чем у больных ИБС.

Представляются интересными различия больных ИБС от пациентов с ГБ, так как последние, по сути, представляют собой популяцию лиц с доклинической фазой течения атеросклеротического поражения сосудов. Так показано, что у больных ИБС в супернатантах выше содержание дефензинов и NT-proBNP. Кроме того для пациентов с ИБС характерна выраженная гиперцитокинемия, проявляющаяся высокой концентрацией ИЛ-6 и ФНО-альфа. Эти данные подтверждают известное мнение о том, что по мере развития атерогенеза увеличивается тяжесть процессов, связанных с провоспалительными изменениями в сыворотке (ИЛ-6, ФНО-альфа) и в сосудистой стенке (дефензины) [139], а также ассоциированные с ними процессы ремоделирования сердечно-сосудистой системы [138,139].

Проведенный анализ взаимосвязей изучаемых показателей выявил следующие закономерности. Связь системных воспалительных реакций и тканевой продукции СРБ косвенно подтверждается наличием прямой корреляции количества лейкоцитов в кровотоке и содержания СРБ в лейкоцитарных супернатантах в группах больных ИБС ($R=0,5$, $p=0,02$). Характер взаимосвязей между содержанием СРБ в лейкоцитарных супернатантах и другими белковыми факторами у здоровых и больных атеросклерозом также был различным. Так в группе здоровых лиц между концентрациями в супернатантах СРБ, VII фактора свертывания и ФВ имелась прямая взаимосвязь ($R=0,5$, $p=0,02$ и $R=0,7$, $p=0,03$ соответственно), а у больных ИБС содержание СРБ в супернатантах коррелировало с концентрацией в них дефензинов ($R=0,37$, $p=0,02$). Данный факт

свидетельствует о разнонаправленности синтетических процессов лейкоцитов в разных клинических условиях.

Наличие прямой корреляции концентрации СРБ в супернатантах и размеров левого предсердия ($R=0,83$, $p=0,02$) у больных нестабильной стенокардией подтверждают клиническое значение оценки содержания этого белка у данных категорий пациентов. В группе больных ГБ без клинических проявлений атеросклероза сывороточная концентрация СРБ была напрямую взаимосвязана с толщиной МЖП ($R=0,71$, $p=0,01$), что позволяет говорить о взаимосвязи процессов субклинического воспаления и ремоделирования сердца.

Корреляционный анализ содержания дефензинов в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах больных ИБС выявил ряд закономерностей. Как было упомянуто выше, в группе больных ИБС получена прямая умеренной силы взаимосвязь содержания в лейкоцитарных супернатантах дефензинов-альфа и величины ЛВСЛ ($R=0,47$, $p=0,01$). В этой же группе была получена прямая взаимосвязь содержания в супернатантах этого антимикробного протеина, БСЖК ($R=0,47$, $p=0,02$), СРБ ($R=0,37$, $p=0,04$) и NT-proBNP ($R=0,4$, $p=0,01$), что свидетельствует о синергизме синтетических программ этих белков, реализующихся в условиях выраженного коронарного атеросклероза. Прямая взаимосвязь содержания СРБ и дефензинов в лейкоцитарных супернатантах была выявлена также в группе больных ИБС нестабильного течения ($R=0,74$, $p=0,01$).

В группе больных ГБ концентрация дефензинов в супернатантах и содержание ФНО-альфа в сыворотке имели сильную прямую корреляцию ($R=0,74$, $p=0,04$), что указывает на то, что продукция дефензинов нейтрофилами находится под контролем цитокинов крови, в данном случае ФНО-альфа. С другой стороны, в группах больных ОААНК показана прямая взаимосвязь количества лейкоцитов и содержания дефензинов в сыворотке ($R=0,8$, $p=0,04$), что подтверждает роль дефензинов как маркеров субклинической воспалительной реакции в условиях атерогенеза.

Наличие прямой корреляции между сывороточным содержанием дефензинов и NT-proBNP в супернатантах у больных ОААНК свидетельствует о

зависимости системных воспалительных реакций и процессов ремоделирования сердца и сосудов у больных атеросклерозом ($R=0,61$, $p=0,04$) [84,213]. В группе больных ИБС получена прямая взаимосвязь содержания дефензинов в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах с ультразвуковыми размерами левых отделов сердца - КДО ($R=0,57$, $p=0,03$), линейными размерами ЛП ($R=0,8$, $p=0,03$) и признаками гипертрофии левого желудочка (толщина МЖП $-R=0,8$, $p=0,02$), что также подтверждает возможную роль дефензинов как маркеров процессов ремоделирования сердца.

Среди изучаемых нами цитокинов наибольшая прогностическая ценность выявлена для ИЛ-6. Так в группах больных ИБС выявлена прямая взаимосвязь сывороточной концентрации ИЛ-6 с размерами левых отделов сердца - КДР ($R=0,39$, $p=0,02$), линейным размером ЛП ($R=0,81$, $p=0,02$) и тяжестью ремоделирования сердца ($R=0,32$, $p=0,01$), а в группе пациентов с ГБ обратная связь с фракцией выброса ЛЖ ($R=-0,49$, $p=0,01$) и прямая с толщиной МЖП ($R=0,46$, $p=0,01$).

Между сывороточными концентрациями ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-альфа установлены прямые корреляции, что подтверждает хорошо известные научные данные о каскаде процессов взаимозависимого синтеза этих цитокинов [248].

В нашем исследовании выявлена взаимосвязь содержания ЛПА в сыворотке крови с суррогатными маркерами ХСН: прямая с размерами левого желудочка (КДО) ($R=0,51$, $p=0,02$) и обратная - с ФВ ЛЖ ($R=-0,49$, $p=0,03$). Полученные данные косвенно свидетельствуют о взаимной обусловленности процессов атерогенеза и патогенеза ХСН в рамках сердечно-сосудистого континуума.

У больных ИБС нестабильного течения содержание VII фактора свертывания и БСЖК в крови имело прямую взаимозависимость ($R=0,85$, $p=0,02$), что можно объяснить общностью процессов тромбообразования и повреждения миокарда у пациентов с нестабильной стенокардией.

В группе больных ИБС отмечена прямая взаимосвязь содержания NT-proBNP в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах ($R=0,69$, $p=0,01$), что свидетельствует о зависимости системного (сывороточная концентрация NT-

proBNP) и тканевого (концентрация NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах) высвобождения этого пептида у больных коронарным атеросклерозом. В группах пациентов с ОААНК выявлена зависимость сывороточной концентрации этого пептида и количества лейкоцитов крови ($R=0,65$, $p=0,02$), что указывает на связь воспалительной реакции и гемодинамического повреждения сердца и сосудов [213].

Представляют интерес полученные нами данные о взаимосвязи содержания в сыворотке крови «традиционных» липидных факторов и концентрации в сыворотке и супернатантах изученных белков. Наиболее сильная связь концентрации холестерина крови и ЛВСЛ ($R=0,78$, $p=0,02$), содержания в супернатантах СРБ и ТГ в сыворотке ($R=0,78$, $p=0,04$), а также NT-proBNP в супернатантах и ЛПВП в сыворотке крови ($R=0,8$, $p=0,02$) отмечена в группе больных ГБ. Подобная же зависимость получена между сывороточным содержанием холестерина, дефензинов альфа ($R=0,8$, $p=0,02$) и ИЛ-8 ($R=0,8$, $p=0,04$) в группе больных ОААНК. Анализ взаимосвязи изученных сывороточных и лейкоцитарных маркеров с «традиционными» липидными факторами риска установил прямую умеренной силы корреляцию между содержанием в супернатантах СРБ и ЛПОНП ($R=0,64$, $p=0,03$), а в сыворотке между VIIф и ЛПНП ($R=0,37$, $p=0,04$). Более слабая связь показателей липидного спектра с изученными сывороточными и лейкоцитарными факторами была в группе больных ИБС, что объясняется тем, что только 12% пациентов с ГБ и 15% больных ОААНК применяли статины, а в группе больных ИБС 88% получали подобную терапию. Полученная зависимость показателей липидного спектра и некоторых тромбофилических и воспалительных маркеров объясняется, по всей видимости, типоспецифической активацией механизмов воспаления и врожденного иммунитета модифицированными липопротеидами, например, через систему Toll рецепторов [47,221].

Для оценки значимости полученных различий между группами наблюдения изучаемых белковых факторов и их ранжирования проведен ROC анализ. Исходя из анализа значений AUC, исследуемые биомаркеры разделены следующим

образом. Сывороточная концентрация дефензинов более 1700 пг/мл расценивается как отличный разделительный критерий между больными сочетанным атеросклерозом и здоровыми лицами. Концентрация в супернатантах ЛПа более 28,59 нг/мл, дефензинов более 210000 пг/мл, в сыворотке крови – СРБ более 3,97 мг/л, VIIф более 2,15 нг/мл и ИЛ-6 более 1,72 пг/мл оцениваются как очень хорошие критерии разделения между больными сочетанным атеросклерозом и здоровыми лицами. Величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л, содержание в лейкоцитарных супернатантах СРБ более 21 мкг/л, VII фактора свертывания более 0,69 нг/мл, NT-proBNP более 21 пг/мл, ФВ более 0,05 ЕД/мл, а в сыворотке NT-proBNP более 47,74 пг/мл расцениваются как хорошие разделительные критерии между больными сочетанным атеросклерозом и здоровыми лицами. Содержание в лейкоцитарных супернатантах VIIф более 0,69 и ИЛ-8 в сыворотке крови более 4,89 пг/мл - как средние по эффективности дифференциально-диагностические критерии. С использованием логистического регрессионного и ROC анализа проведена комплексная оценка белково-пептидного паттерна, включающего содержание в супернатантах ЛПа, дефензинов, СРБ, NT-proBNP, концентрации в сыворотке крови дефензинов, СРБ и VIIф, а также величины ЛВСЛ. Математическая модель взаимодействия факторов показала максимально возможную диагностическую эффективность (AUC-1). Таким образом, можно говорить об оптимальности комплексного определения белковых факторов в лейкоцитарных супернатантах для маркировки процессов атерогенеза.

В ходе анализа Парето определена выявляемость высокого содержания изученных маркеров (по точкам разделения). Так высокие значения концентраций дефензинов в лейкоцитарных супернатантах выявлялись в 92%, СРБ - в 75%, ЛПа - в 91%, ФВ - в 71%. ЛВСЛ, превышающая 0,15 ммоль/л, определялась в 75% наблюдений.

Анализ частоты выявляемости у здоровых лиц высоких значений изучаемых факторов показал, что сывороточные и лейкоцитарные маркеры обнаруживаются

в больших концентрациях на порядок реже. Данный факт свидетельствует об активности белковой продукции лейкоцитов у больных атеросклерозом.

Подобный подход был использован и на других клинических моделях атерогенеза. В группе больных ИБС, операционные характеристики факторов ранжируется следующим образом: концентрации в лейкоцитарных супернатантах дефензинов свыше 210000 пг/мл, NT-proBNP более 21 пг/мл, ФВ свыше 0,07 ЕД/мл, VIIф более 0,64 нг/мл имеют отличную разделительную (от здоровых лиц) эффективность у больных ИБС; СРБ более 25,33 мкг/л – очень хорошую, а ЛПа свыше 28,23 нг/мл - хорошую. Содержание в сыворотке крови дефензинов-альфа более 1700 пг/мл, СРБ – выше 3,91 мг/л и VIIф – более 2,22 нг/мл рассматриваются как отличные разделительные критерии между больными ИБС и здоровыми лицами, концентрации NT-proBNP более 23,87 пг/мл и ИЛ-6 – выше 1,72 пг/мл - как очень хороший, а ИЛ-8 более 4,89 пг/мл – как средний показатель. Для величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л получены средние операционные характеристики. Комплексный подход с использованием оценки концентрации в супернатантах VIIф, NT-proBNP, дефензинов; дефензинов-альфа, СРБ и VIIф в сыворотке, а также величины ЛВСЛ имел максимально возможную эффективность (AUC-1,0). Согласно диаграммы Парето, построенной по точкам разделения в группе больных ИБС, в 100% случаев в супернатанатах выявились дефензины, в 100%- фактор Виллебранда, в 99% - NT-proBNP, в 67% - СРБ, в 99% - VII фактор свертывания и в 86%- ЛПа. Высокие значения ЛВСЛ определялись только в 46% наблюдений.

В группе больных ИБС нестабильного течения, в отличие от стабильной формы этого заболевания, определялись значимо более высокие величины ЛВСЛ ($0,21 \pm 0,02$, ммоль/л). Наилучшие операционные характеристики в разграничении стабильной и нестабильной формы ИБС получило значение величины ЛВСЛ более 0,18 ммоль/л (хорошая характеристика, AUC – 0,77) и концентрации дефензинов в сыворотке более 4000 пг/мл (средняя характеристика, AUC – 0.65). Комплексная оценка этих двух критериев, позволяет увеличить эффективность разграничения нестабильной и стабильной стенокардии (AUC-0,94). Согласно

диаграмме Парето распределение выявляемых высоких значений лейкоцитарных факторов было следующим: в 100% случаях определялись высокие концентрации в супернатантах дефензинов, ЛПа, в 90% - NT-proBNP и VIIф, в 60% -СРБ. Высокие значения ЛВСЛ выявлялись в 100% случаев.

У больных ОААНК ранжирование операционных характеристик исследованных показателей несколько отличалось от группы больных ИБС. Изучаемые показатели по своей эффективности распределились следующим образом: значение концентрации ЛПа в лейкоцитарных супернатантах более 35,21 нг/мл расценено как отличный разделительный критерий между больными ОААНК и здоровыми лицами, содержание дефензинов-альфа в сыворотке крови свыше 1300 пг/мл и величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л – как хороший, концентрация СРБ в супернатантах более 19,5 мкг/л и ФВ более 0,05 ЕД/мл – как средний показатель. Комплексная оценка белково-пептидного паттерна, включающая содержание дефензинов-альфа в сыворотке, ЛПа и СРБ в супернатантах, а также величину ЛВСЛ показала отличные операционные характеристики (AUC -1,0).

Анализ диаграммы Парето также выявил некоторые особенности встречаемости высоких концентраций белков в лейкоцитарных супернатантах. Так в 100% случаев в супернатантах обнаруживалась высокая концентрация ЛПа, в 73% -ФВ и в 71% - СРБ. В 50% определялись большие величины ЛВСЛ. Показано, что при наличии признаков нестабильной бляшки и проксимального типа поражения артериального русла в лейкоцитарных супернатантах чаще выявляется СРБ (100%). При дистальном поражении сосудистого русла у больных ОААНК возрастает частота обнаружения высоких сывороточных концентраций дефензинов (100%). Данная особенность белкового «пейзажа» объясняется, по всей видимости, преобладающими механизмами провоспалительного ответа в различных клинических ситуациях.

Большой интерес представляют результаты оценки эффективности изучения обсуждаемых биомаркеров в группе больных ГБ, так как именно эту клиническую

группу можно рассматривать как модель начального этапа сердечно-сосудистого континуума в аспекте формирования атеросклеротического поражения сосудов.

Анализ значения AUC показал, что концентрация дефензинов-альфа в сыворотке крови более 1300 пг/мл имеет отличную разделительную эффективность между больными ГБ и здоровыми лицами; содержание NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах превышающее 21 пг/мл - очень хорошую, дефензинов-альфа - более 210000 пг/мл хорошую, а сывороточная концентрация ИЛ-8 более 3,39 пг/мл – среднюю эффективность. Значение ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л имело неудовлетворительные разделительные свойства. Комплексная оценка белково-пептидного паттерна, построенная на определении содержания в супернатантах NT-proBNP, а в сыворотке крови - дефензинов-альфа показала отличную эффективность (AUC-0,95).

ROC анализ выявил, что значение концентрации дефензинов в супернатанте более 300214 пг/мл, ИЛ-6 в сыворотке крови более 2,58 пг/мл и величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л являются хорошими разделительными критериями между больными ИБС стабильного течения и ГБ, а содержание ФНО-альфа в сыворотке крови свыше 12,23 пг/мл- средним. Комплексный подход, с использованием всех четырех показателей в оценке белково-пептидного паттерна позволяет повысить эффективность разграничения данных заболеваний до очень хорошего уровня (AUC-0,83).

На основании полученных данных нами предложены оптимальные алгоритмы обследования пациентов в разных клинических ситуациях.

В случае скрининга, проводимого у клинически здоровых лиц с факторами риска, для выявления ранних стадий атерогенеза целесообразно исследовать содержание дефензинов и NT-proBNP в лейкоцитарных супернатантах и дефензинов-альфа в сыворотке крови. При превышении значений концентрации дефензинов-альфа в сыворотке крови более 1300 пг/мл, а в супернатантах дефензинов-альфа более 210000 пг/мл и NT-proBNP более 21 пг/мл рекомендуется дополнительное обследование, верифицирующее наличие атеросклероза.

В случае диагностики ИБС спектр рекомендованных исследований может быть шире и включать: определение величины ЛВСЛ, концентрации дефензинов-альфа в супернатантах, СРБ, ЛПа, VII фактора свертывания, ФВ, NT-proBNP, в сыворотке крови – дефензинов. При превышении значений величины ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л, концентрации в супернатантах дефензинов более 210000 пг/мл, СРБ более 25,33 мкг/л, ЛПа более 28,23 нг/мл, NT-proBNP более 21 пг/мл, ФВ более 0,07 ЕД/мл, VII фактора свертывания более 0,64 нг/мл, а в сыворотке – дефензинов-альфа более 1700 пг/мл рекомендуется выполнить исследования, верифицирующие наличие коронарного атеросклероза, в том числе при необходимости и ангиографические.

При выявлении клинических признаков и факторов риска ОААНК спектр рекомендованного обследования может быть следующим: определение содержания в лейкоцитарных супернатантах ЛПа, СРБ и ФВ, в сыворотке крови – дефензинов, а также величины ЛВСЛ. При превышении значений концентраций в супернатантах ЛПа более 35,21 нг/мл, СРБ более 19,5 мкг/л, ФВ более 0,05 ЕД/мл, 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.

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

Для дифференциальной диагностики доклинического атеросклероза (больные ГБ) и клинически манифестного поражения коронарных артерий (больные ИБС) полезным оказалось выявление величины содержания дефензинов в супернатантах более 300214 пг/мл и ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л.

В группе больных атеросклерозом сочетанного течения, которые по разным причинам до включения в исследование статины не принимали, комплексная терапия в течение 6 месяцев с включением этих препаратов приводила к

снижению ЛВСЛ с 0,16 (0,09; 0,24) ммоль/л до 0,12 (0,1;0,16) ммоль/л, концентрации СРБ в супернатантах с 46,94 (10,40;91,20) мкг/л до 34,35 (4,30;78,85) мкг/л и дефензинов с 608454 (200000;949000) пг/мл до 369154 (89720;465123) пг/мл. Данный факт объясняется плейотропными эффектами статинов реализуемыми через модуляцию активности нейтрофилов. В течение последнего десятилетия получены новые данные указывающие на то, что ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А редуктазы обладают способностью модулировать активность нейтрофильного воспаления [242]. Sugano et al. в клинических условиях показали, что *ex vivo* эндотелиальная адгезивность нейтрофилов, полученных от лиц с гиперхолестеринемией, была более выраженной по сравнению с контролем и ослабевала через 3 месяца лечения флувастатином (20 мг/день) независимо от его липидкорректирующего эффекта [242]. Ван Осторн et al. установили, что лечение розувастатином (20 мг/день в течение 1 месяца, затем по 40 мг/сут в течение еще 1 месяца) уменьшает миграцию нейтрофилов у пациентов с умеренной гиперлипидемией и ранним началом ишемической болезни сердца, что также не было связано с улучшением метаболизма липопротеинов [262].

Таким образом, нами получены данные, подтверждающие 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 программы белкового синтеза. 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. Показано, что большинство адьювантов, имитируя микробную инфекцию, инициируют рецепторы врожденной иммунной системы и вызывают выделение белков. Ключевую роль в этой системе играют Толл-подобные рецепторы, через которые

при контакте с определенными структурными компонентами активируется синтез антимикробных пептидов [221,223], в том числе дефензинов.

Эволюционная роль большинства из изученных нами белковых факторов состоит в уничтожении и отграничении чужеродного антигена. Так дефензины и СРБ непосредственно связаны с системой противомикробного иммунитета, ЛПа - с репаративной активностью и ангиогенезом, ФВ и VIIф - с тромботическими процессами, отграничивающими чужеродный очаг. Часть из этих белков синтезируются конституционально (ЛПа, VII фактор и др), другие преимущественно индуцибельно (СРБ) и, наконец, концентрация ряда белков может определяться, как конституциональным синтезом, так и индуцибельным (дефензины). 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 белкового синтеза лейкоцитами, в первую очередь нейтрофилами, выступающей как компонент ограничения и уничтожения чужеродных антигенов (схема 3). 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 и СРБ. Процесс высвобождения нейтрофилами белков регулируется также опосредованно через взаимодействие с другими клетками, в том числе эндотелиоцитами (схема 3). Таким образом, реализуется связь процессов гемодинамического повреждения эндотелия (артериальная гипертензия) и воспаления. Часть высвобождаемых белково-пептидных факторов синтезируется непосредственно нейтрофилами (СРБ, дефензины и, возможно и NT-proBNP), другие накапливаются в цитоплазме последних в ходе процесса интернизации, то есть 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), ограничения регионального кровотока – тромбоза (ФВ, VIIф, ЛПа) или путем активации неоангиогенеза (ЛПа). Однако генетически предопределенная система реагирования на вторжение чужеродных агентов в условиях постоянной стимуляции (дислипидемия, АГ и другие факторы) носит дезадаптивный характер и способствует, а иногда инициирует атерогенез.

События, происходящие в рамках сердечно-сосудистого континуума носят, на наш взгляд, определенную стадийность (схема 4). Показано, что наиболее ранние изменения, проявляющиеся у больных ГБ, связаны с изменением высвобождения белков, определяющих потенциал противoinфекционного ответа (дефензины) и ремоделирование сердечно-сосудистой системы (NT-proBNP). Определение этих двух белков целесообразно по той причине, что одни (дефензины–альфа) неспецифично отражают активность нейтрофильного воспаления, а другие (NT-proBNP) определяют специфику изменений, происходящих у больных с доклиническим атеросклерозом. По мере развития атерогенеза спектр высвобождаемых белков становится шире, включаются новые

патогенетические механизмы, связанные с тромбофилией (ФВ, VПф, ЛПа), репаративными изменениями (ЛПа), увеличивается значимость провоспалительных изменений (СРБ). У пациентов с клинически манифестным атеросклерозом возрастает значение ЛВСЛ, комплексно отражающей происходящие события образования белков, высвобождения микрочастиц и полимерализации белково-липидных комплексов во внеклеточном пространстве. Наиболее активно эти процессы происходят в случае активации атерогенеза (нестабильные атеросклеротические бляшки), тяжелом и распространенном процессе (сочетанное течение атеросклероза). Взаимосвязь белкового высвобождения и ЛВСЛ возрастает по мере увеличения выраженности процессов формирования атеросклеротического поражения.

Исходя из сказанного выше, представляется, что изучение белковых факторов, синтезируемых и/или высвобождаемых нейтрофилами, дает возможность как ранней диагностики процессов атерогенеза, так и оценки тяжести, активности и распространенности формируемых поражений. В ряде случаев белково-пептидный паттерн позволяет понять доминанту происходящих изменений в разных клинических ситуациях. Кроме того появляются новые критерии эффективности проводимой терапии, например, статинами, что можно использовать в реальной клинической практике.

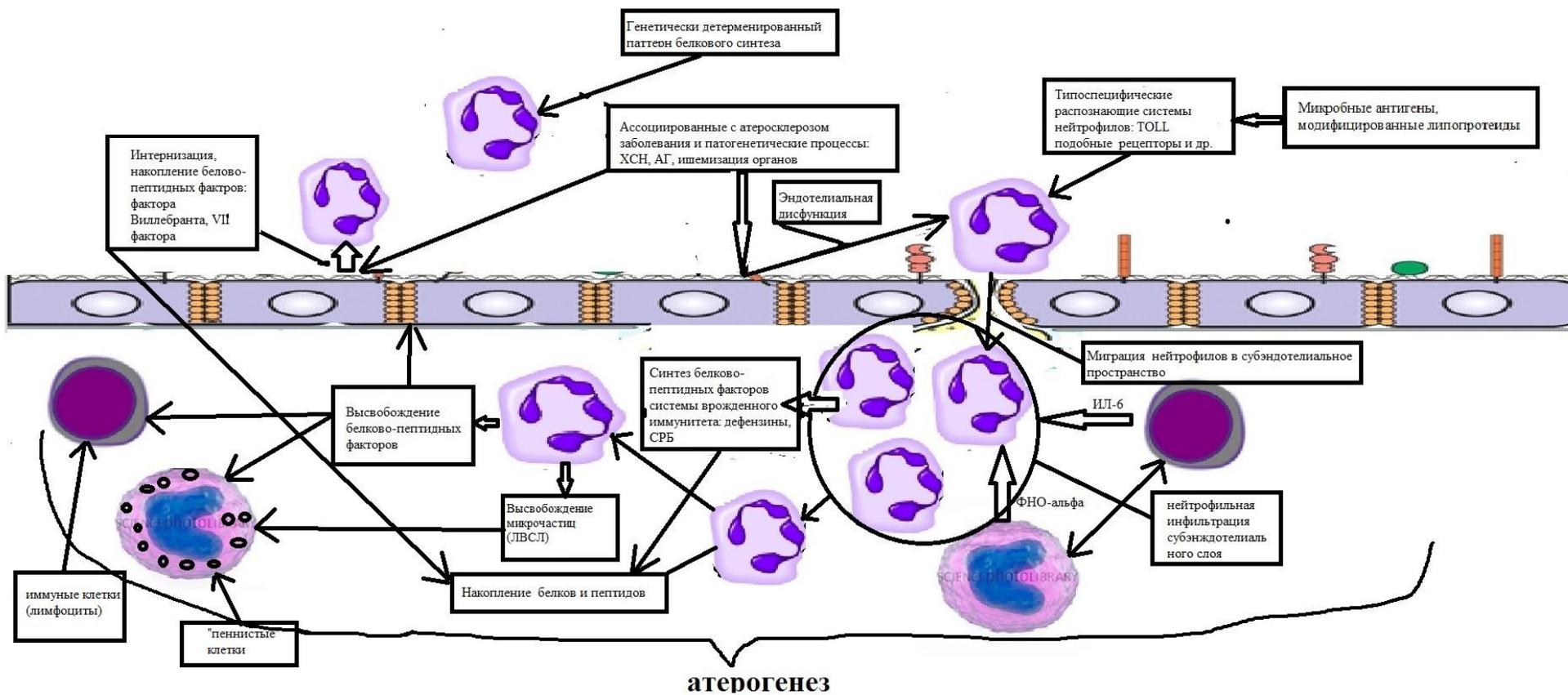


Схема 3. Принципиальная схема атерогенеза с участием нейтрофилов



Схема 4. Атерогенез, место маркерующих его сывороточных и лейкоцитарных факторов на этапах сердечно-сосудистого континуума

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 СОКРАЩЕНИЙ

Сокращенное название	Полное название
АГ	артериальная гипертензия
АДФ агрегация	аденозин дифосфат индуцированная агрегация
АМП	антимикробные протеины
АПТВ	активированное парциальное тромбопластиновое время
АРМ	адаптивное ремоделирование миокарда
БДМ	бессимптомная дисфункция миокарда
ГБ	гипертоническая болезнь
ГМК	гладко-мышечные клетки
ДБХ	дистанция безболевого ходьбы
ДГ	доплерография
ДРМ	дезадаптивное ремоделирование миокарда
ДС	дуплексное сканирование
ЗСЛЖ	задняя стенка левого желудочка
ИА	индекс атерогенности
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИКДР	индекс конечного диастолического размера
ИЛ-1	интерлейкин 1
ИЛ-2	интерлейкин 2
ИЛ-6	интерлейкин-6
ИЛ-8	интерлейкин-8
ИМ	инфаркт миокарда
ИММЛЖ	индекс массы миокарда левого желудочка
ИНФ-гамма	интерферон гамма
ИОТС	индекс относительной тощины стенки
ИФА	иммуноферментный анализ
КДО	конечный диастолический объем
КДР	конечный диастолический размер
КСО	конечный систолический объем
КСР	конечный систолический размер
КШ	коронарное шунтирование
ЛВСЛ	липидвысвобождающая способность лейкоцитов
ЛЖ	левый желудочек
ЛП	левое предсердие
ЛПа	Липопротеин (а)
ЛПВП	липопротеиды высокой плотности
ЛПИ	лодыжечно-плечевой индекс
ЛПНП	липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	липопротеиды очень низкой плотности
ЛСК	линейная скорость кровотока
МЖП	межжелудочковая перегородка
МИ	мозговой инсульт
МКБ	мочекаменная болезнь
ММЛЖ	масса миокарда левого желудочка
ММП	матричные металлопротеиназы
ОААНК	облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей
ОКС	острый коронарный синдром
ПЖ	правый желудочек

ПМН	полиморфно-ядерные нейтрофилы
ПП	правое предсердие
ПТВ	протромбиновое время
РФМК	растворимые фибрин мономерные комплексы
СД	сахарный диабет
СДЛА	среднее давление в легочной артерии
СКФ	скорость клубочковой фильтрации
СРБ	С-реактивный белок
ССЗ	сердечно-сосудистые заболевания
ССК	сердечно-сосудистый континуум
СТС	средняя толщина стенки
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
ФП	фибрилляция предсердий
ХАН	хроническая артериальная недостаточность
ХБП	хроническая болезнь почек
ХГД	хронический гастродуоденит
ХЗФ	хагеман зависимый фибринолиз
ХОБЛ	хроническая обструктивная болезнь легких
ХП	хронический панкреатит
ХСН	хроническая сердечная недостаточность
ХХ	хронический холецистит
ЦВБ	цереброваскулярная болезнь
ЧСС	частота сердечных сокращений
ЯБ	язвенная болезнь
ANP	предсердный натрийуретический пептид
BNP	мозговой натрийуретический пептид
CXCR 4	хемотаксический рецептор 4 типа
HNp	человеческих нейтрофилов пептиды
ICAM-1	молекула межклеточной адгезии
LMPs	лейкоцитпроизводные микрочастицы
MCP-1	моноцитарный хемотаксический фактор 1
M-CSF	моноцитарный колониестимулирующий фактор
MP _s	микрочастицы
NFκB	нуклеарный фактор κB
NP	натрийуретические пептиды
NT-proBNP	NT фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида
PAI-1	ингибитор активатора плазминогена
PDGF	тромбоцитарный фактор роста
TF	тканевой фактор
TLR	TOLL подобные рецепторы

СПИСОК НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байдина, Т.В. Способ диагностики атеротромботического подтипа ишемического инсульта/ Т.В. Байдина, А.А. Шутов, В.Ю. Мишланов, А.В. Агафонов, О.В. Сюткина //№ 2266545 от 20.12.2005.
2. Бурцева, Т.В. Сывороточные биомаркеры воспаления и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью различных функциональных классов: автореферат дисс. канд. мед. наук / Бурцева Татьяна Владимировна. - Пермь, 2011 - 25 стр.
3. Визир, В.А.. Иммуновоспалительная активация как концептуальная модель формирования и прогрессирования сердечной недостаточности/ В.А.Визир., А.Е. Березин// Терапевт. арх. - 2000. - № 4. - С. 77 —80.
4. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение, пер. с англ./ Б. Глик, Дж. Пастернак. - М.: Мир, 2002.- 589 с.
5. Гринхальх, Т. Основы доказательной медицины: пер. с англ. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006.-240с.
6. Кузнецов, И.В. Диагностика атеросклеротического поражения сонных артерий в практике кардиолога / И.В. Кузнецов // Ліки України. – 2011. – №6. – С. 72–76.
7. Кухарчук, В.В. Атеросклероз: от А.Л. Мясникова до наших дней/ В.В. Кухарчук, Э.М. Тарарак// Кардиологический вестник- 2010.- №1.- С.12-20.
8. Мишланов, В.Ю. Способ диагностики функционального класса хронической сердечной недостаточности у больных стенокардией/ В.Ю.Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова, Е.А. Челебаева// № 2462175 от 28.02.2011.
9. Мишланов, В.Ю. Способ оценки белок синтезирующей функции лейкоцитов для клинических исследований/ В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова//№ 2530593 от 14.08.2014.

10. Мишланов, В.Ю. Метод липидвысвобождающей способности лейкоцитов в диагностике механизмов атерогенеза у больных ишемической болезнью сердца и мозговым ишемическим инсультом/ В.Ю. Мишланов, А.В. Туев, А.А. Шутов, Т.В. Байдина, О.В. Сюткина, О.В. Обухова // Клин. лаб. диагностика.- 2006.- № 5.- С. 9-12.
11. Национальные рекомендации ОССН, РКО и РНМОТ по диагностике и лечению ХСН (четвертый пересмотр)//Журнал сердечная недостаточность. – 2013 - Т. 14 - №7(81).- С. 380-472.
12. Национальные рекомендации по кардиоваскулярной профилактике, 2011.
13. Национальные рекомендации Российского кардиологического общества (РКО), Научного общества нефрологов России (НОНР), Российской ассоциацией эндокринологов (РАЭ), Российского медицинского общества по артериальной гипертензии (РМОАГ), Национального общества по изучению атеросклероза (НОА), Российского научного медицинского общества терапевтов (РНМОТ) по сердечно-сосудистому риску и хронической болезни почек: стратегия кардионепропротекции, 2013.
14. Обухова, О.В. Клинико-патогенетическая значимость липидвысвобождающей способности лейкоцитов в комплексной оценке течения атеросклероза у больных ишемической болезнью сердца: автореферат дисс. канд. мед. наук / Обухова Ольга Владимировна. - Пермь, 2008 - 26 стр.
15. Оганов, Р.Г. Профилактика сердечно-сосудистых и других неинфекционных заболеваний - основа улучшения демографической ситуации в России / Р.Г. Оганов, Г.Я. Масленникова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2005. - № 3. - С. 4-9.
16. Орехов, А.Н. Митогенная активность липопротеидов низкой плотности, выделенных из крови больных с коронарным атеросклерозом/А.Н.Орехов, В.В.Тертов// Цитология. - 1989.- Т.31(8). – С.1116-1117.
17. Покровский, А.В. Клиническая ангиология/ А.В. Покровский. - М.: Медицина, 2004. – Том 1. – 808 с.

18. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва .- М.: МедиаСфера.2006. – 312 с.
19. Рогоза, А.Н. Методы определения лодыжечно-плечевого индекса систолического давления при массовых обследованиях / А.Н. Рогоза, Т.В. Балахонова, Н.М. Чихладзе // Consilium medicum. - 2010. - N 2. - С.77-85.
20. Терещенко, С.Н. Апоптоз и иммунный статус больных острым инфарктом миокарда и сердечной недостаточностью/ С.Н. Терещенко, Г.В. Бармотин, А.А. Соколовская// Успехи клинич. иммунологии и аллергологии. Т. 1. / Под ред. А.В. Караулова. - М.: Изд-во РАЕН, 2000. - С. 179—190.
21. Тертов, В.В. Метаболизм липидов в клетках атеросклеротической аорты человека. Исследования в первичной культуре./ В.В.Тертов, А.Н.Орехов, В.А. Косых, В.С. Репин// Бюлл. эксп. биол. мед. - 1982. -№;94(1). –С.83-85.
22. Туев, А.В. Экспериментальные предпосылки новой теории атерогенеза. Болезни сердечно-сосудистой системы: теория и практика./ А.В. Туев, В.Ю. Мишланов // Материалы I съезда кардиологов Приволжского и Уральского Федеральных округов Российской Федерации.- Пермь, 2003.- С. 258-265.
23. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Р.Флетчер, С.Флетчер, Э.Вагнер. – М.: Изд-во Медиа Сфера, 1998.– 352 с.
24. Ярилин, А.А. Основы иммунологии/А.А. Ярилин – М.: Медицина, 1999. – 608 с.
25. Albers, J. Relationship of apolipoproteins A-1 and B, and lipoprotein (a) to cardiovascular outcomes in the AIM-HIGH trial (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglyceride and Impact on Global Health Outcomes)/J. Albers, A. Slee, K. O'Brien// J Am Coll Cardiol.- 2013.- V.62.-P.1575-1579.
26. Allan, P. Evidence that fibrinogen gamma directly interferes with protofibril growth: implications for fibrin structure and clot stiffness/ P.Allan, S.Uitte de Willige, R. Abou-Saleh//J Thromb Haemost.- 2012.-V.10.- P.1072-1080.

27. Ammash, N. Left atrial blood stasis and Von Willebrand factor-ADAMTS13 homeostasis in atrial fibrillation/ N.Ammash, E. Konik, R. McBane// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*-2011.-V.31.-P.2760-2766.
28. Anderson, T. 2012 Update of the Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult/ T.Anderson, J. Grégoire, R. Hegele// *Can J Cardiol.*- 2013.-V.29.-P.151-167.
29. Andersson, H. High VWF, low ADAMTS13, and oral contraceptives increase the risk of ischemic stroke and myocardial infarction in young women/H. Andersson, B. Siegerink, B. Luken// *Blood.*-2012.-V.119.-P.1555-1560.
30. Angeillo-Scherrer, A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis/ A. Angeillo-Scherrer// *Circ Res* - 2012.- N.110: - P. 356-369.
31. Armitage, J. Behalf of the THRIVE Collaborative Group. HPS2-THRIVE: Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events/ J. Armitage// *American College of Cardiology Scientific Sessions.*- 2013.- P.1254-1265.
32. Assmann, G. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study/ G.Assmann, P. Cullen, H. Schulte// *Circulation.* – 2002.- N.105: - P.310-315.
33. Baetta, Roberta. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: Current state and future perspectives/Roberta Baetta, and Alberto Corsini// *Atherosclerosis.* - 2010.- V. 210. – I. 1.- P. 1-13 .
34. Battistoni, Allegra. Circulating biomarkers with preventive, diagnostic and prognostic implications in cardiovascular diseases/Allegra Battistoni, Speranza Rubattu, and Massimo Volpe// *International Journal of Cardiology/-* 2012-05-31/ - Volume 157. - Issue 2.- P. 160-168.
35. Benjamin, E. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study/ E. Benjamin, P. Wolf, R. D'Agostino, H. Silbershatz, W.Kannel, D. Levy// *Circulation.* - 1998. -V.98.- №10. - P.946-952.

36. Bisoendial, R. C-reactive protein is a mediator of cardiovascular disease/ R. Bisoendial, S. Boekholdt, M. Vergeer// *Eur Heart J* – 2010.- V.31.-P. 2087-2091.
37. Bisoendial, Radjesh J. Clinical Significance C-Reactive Protein Elicits White Blood Cell Activation in Humans /Radjesh J. Bisoendial, Rakesh S. Birjmohun, Fatima Akdim, Cornelis van 't Veer, C. Arnold Spek, Daniel Hartman, Els R. de Groot, Danute M. Bankaitis-Davis, John J.P. Kastelein, and S.G. Erik// *Stroes American Journal of Medicine*. - 2009-06-01. – V.122.- I. 6.- P. 582.e1-582.e9.
38. Boden, W. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy/ W. Boden, J. Probstfield, T. Anderson// *N Engl J Med*.- 2011.- V.365.-P.2255-2267.
39. Boekholdt, S. The interleukin-6 pathway and atherosclerosis/ S. Boekholdt, E. Stroes// *Lancet*.- 2012.-V.379.-P.1176-1178.
40. Bonello, L. High on-treatment platelet reactivity after prasugrel loading dose and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes/ L. Bonello, M. Pansier, J. Mancini// *J Am Coll Cardiol*.- 2011.-V.58.-P.467-473
41. Bonow, Robert O. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine , Ninth Edition/Robert O. Bonow, Douglas L. Mann, Douglas P. Zipes, and Peter Libby.-2012.-Chapter 61.-P.1338-1358.
42. Bope, T. Conn's Current Therapy//T. Bope, and Rick D. Kellerman/ Section 7. - 2014.- P. 407-482.
43. Botto, Nicoletta An increased platelet–leukocytes interaction at the culprit site of coronary artery occlusion in acute myocardial infarction: A pathogenic role for “no-reflow” phenomenon?/ Nicoletta Botto, SILverio Sbrana, Giuseppe Trianni, Maria Grazia Andreassi, Marcello Ravani, Antonio Rizza, Anees Al-Jabri, Cataldo Palmieri, and Sergio Berti// *International Journal of Cardiology*.- 2007-04-12.- V.117.- I. 1.- P. 123-130.

44. Braunwald, E. Creating controversy where none exists: the important role of C-reactive protein in the CARE, AFCAPS/TexCAPS, PROVE IT, REVERSAL, A to Z, JUPITER, HEART PROTECTION, and ASCOT trials/E. Braunwald//*Eur Heart J.* - 2012.-V.33.-P.430-432.
45. Brightbill, H. D. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors/ H. D. Brightbill, D. H. Libraty, S. R. Krutzik//*Science.* – 1999. – V. 285. – P. 732-736.
46. Campbell, J. H. The cell biology of atherosclerosis— new developments/ G. R. Campbell, J. H. Campbell//*Aust N Z J Med.*- 1997.- V.27(4).- P.497-500.
47. Campbell, L. A. Chlamydia pneumonia - an infectious risk factor for atherosclerosis?/ L. A. Campbell, C. C. Kuo // *Nat Rev Microbiol.* – 2004. - V.2. – P. 23-32.
48. Campo, Gianluca. Coagulation Factors and Recurrence of Ischemic and Bleeding Adverse Events in Patients with Acute Coronary Syndromes/ Gianluca Campo, Rita Pavasini, Alberto Pollina, Matteo Tebaldi, and Roberto Ferrari// *Thrombosis Research.*- 2013-08-01.- V. 132.- I. 2.- P.151-157.
49. Carroll, M. D. Trends in lipids and lipoproteins in US adults, 1988-2010/ M. D. Carroll, B. K. Kit, D. A. Lacher, S. T. Shero, M. E. Mussolino//*JAMA.* – 2012. –V.308(15).- P. 1545-1554.
50. Celik, Turgay C-reactive protein in chronic heart failure: A new predictor of survival/ Turgay Celik, Atilla Iyisoy, Murat Celik, U. Cagdas Yuksel, and Ejder Kardesoglu// *International Journal of Cardiology.* - 2009-07-10.- V. 135. – I. 3. – P. 396-397.
51. Chan, D. Biomarkers in acute myocardial infarction/ D. Chan, L. Ng// *BMC Med.* – 2010.- V.8.- P. 34-45.
52. Chen, F. Lipid-altering efficacy and safety profile of coadministered extended release niacin/laropiprant and simvastatin versus atorvastatin in patients with mixed hyperlipidemia/ F. Chen, D. Maccubbin, L. Yan//*Int J Cardiol.*- 2013.- V.167.-P.225-231.

53. Clarke, R. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease/ R. Clarke, J. Peden, J. Hopewell// *N Engl J Med.* – 2009.- V. 361.- P. 2518-2528.
54. Cole, T. Association of apolipoprotein B and nuclear magnetic resonance spectroscopy-derived LDL particle number with outcomes in 25 clinical studies: assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices/ T. Cole, J. Contois, G. Csako// *Clin Chem.*- 2013.- V.59.- P.752-770.
55. Collier, B. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene?/ B. Collier// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005.- V. 25.- P. 658-670.
56. Cook, N. Clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A (2) for cardiovascular disease prediction in a multiethnic cohort of women/ N. Cook, N. Paynter, J. Manson// *Clin Chem.*- 2012.- V.58.- P.1352-1363.
57. Cronenwett, Jack L. Rutherford's Vascular Surgery, / Jack L. Cronenwett, and K. Wayne Johnston// Eighth Edition.- 2014. - Chapter 5. – P. 66-77.
58. Dalen, James E. The Epidemic of the 20 th Century: Coronary Heart Disease/ James E. Dalen, Joseph S. Alpert, Robert J. Goldberg, and Ronald S. Weinstein// *American Journal of Medicine.*- 2014.
59. Danesh, J. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies/ J. Danesh, R. Collins, R. Peto// *Circulation.* – 2000. – V. 102.- P. 1082-1085.
60. Daniels, L. Natriuretic peptides/ L. Daniels, A. Maisel// *J Am Coll Cardiol.* – 2007.- V. 50.- P. 2357-2368.
61. Davidson, M. Clinical utility of inflammatory markers and advanced lipoprotein testing: advice from an expert panel of lipid specialists/ M. Davidson, C. Ballantyne, T. Jacobson// *J Clin Lipidol.*- 2011.- V.5.- P.338-367.
62. Davies, P.F. Hemodynamic forces and vascular cell communication in arteries/ P.F. Davies, A. Robotewskyj, M.L. Griem, R.O. Dull, D.C. Polacek // *Arch Pathol Lab Med.*-1992.- V.116:-P. 1301-1306.

63. Davies, P. F. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis/ P.F.Davies// *Lab Invest.* – 1986. –V. 55.- P. 5-24.
64. Davies, R. A genome-wide association study for coronary artery disease identifies a novel susceptibility locus in the major histocompatibility complex/ R.Davies, G. Wells, A. Stewart// *Circ Cardiovasc Genet.*- 2012.-V.5.-P.217-225.
65. De Meyer, S. Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice/ S.De Meyer, A. Savchenko, M. Haas// *Blood.*-2012.-V.120.-P.5217-5223.
66. De Roos, B. A key role for dietary bioactives in the prevention of atherosclerosis/ B. De Roos// *Mol Nutr Food Res.*- 2012. –V.56(7).- P.1001-1002.
67. Dehghan, A. Meta-analysis of genome-wide association studies in >80 000 subjects identifies multiple loci for C-reactive protein levels/ A.Dehghan, J. Dupuis, M. Barbalic// *Circulation.*-2011.-V.123.-P.731-738.
68. Demetz, G. Tissue Factor–Factor VIIa complex induces cytokine expression in coronary artery smooth muscle cells//G. Demetz, I. Seitz, A. Stein, B. Steppich, P. Groha, R. Brandl, A. Schömig, and I. Ott// *Atherosclerosis.* - 2010-10-01. – V. 212.- I. 2.- P. 466-471.
69. Deo, R. Single-nucleotide polymorphisms in LPA explain most of the ancestry-specific variation in Lp(a) levels in African Americans/ R.Deo, J. Wilson, C. Xing// *PLoS One.*-2011.-V.6.-P.4581.
70. Desai, N. AMG 145, a monoclonal antibody against pcsk9, significantly reduces lipoprotein (a) in hypercholesterolemic patients receiving statin therapy: an analysis from the LAPLACE-TIMI 57 trial /N. Desai, P. Kohl, R. Giugliano// *Circulation.*- 2013.-V.128.- P.962-969.
71. Devaraj, S. C-reactive protein induces release of both endothelial microparticles and circulating endothelial cells in vitro and in vivo: further evidence of endothelial dysfunction/ S.Devaraj, P. Kumaresan, I. Jialal// *Clin Chem.*- 2011.- V.57.-P.1757-1761.

72. Di Angelantonio, E. B-type natriuretic peptides and cardiovascular risk: systematic review and meta-analysis of 40 prospective studies/ E. Di Angelantonio, R. Chowdhury, N. Sarwar// *Circulation*. – 2009. –V.120. – P. 2177-2187.
73. Doi, M. ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction/ M. Doi, H. Matsui, H. Takeda// *Thromb Haemost.*-2012.- V.108.-P.1236-1238.
74. Donetti, E. Polymorphonuclear leukocyte-myocyte interaction: an early event in collar-induced rabbit carotid intimal thickening/ E. Donetti, R. Baetta, C. Comparato// *Exp Cell Res.*- 2002.- V. 274.-P.197-206.
75. Dragu, R. Predictive value of white blood cell subtypes for long-term outcome following myocardial infarction/ R. Dragu, S. Huri, R. Zuckerman. *Atherosclerosis* 2008. –V.196.- P.405-412.
76. Dumitrescu, L. Variation in LPA is associated with Lp(a) levels in three populations from the Third National Health and Nutrition Examination Survey/ L. Dumitrescu, K. Glenn, K. Brown-Gentry// *PLoS One*.- 2011.-P.166-174.
77. Emberson, J. Heart Protection Study Collaborative Group: C-reactive protein concentration and the vascular benefits of statin therapy: an analysis of 20,536 patients in the Heart Protection Study/ J. Emberson, D. Bennett// *Lancet*.- 2011.- V.377.- P. 469-476.
78. Engelmann, B. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity/ B. Engelmann, S. Massberg S// *Nat Rev Immunol*.- 2013.-V.13.- P.34-45.
79. Erqou, S. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality/ S. Erqou, S. Kaptoge, P. Perry// *JAMA*.- 2009.- V. 302.- P. 412-423.
80. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension // *Eur Heart J*. – 2013. – Vol. 34. – P. 2159–2219.

81. Etscheid, M. The Marburg I polymorphism of factor VII activating protease is associated with low proteolytic and low pro-coagulant activity/ M. Etscheid, L. Muhl, D. Pons, J.W. Jukema, H. König, and S.M. Kanse//
82. Fawcett, T. ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Researchers/ Y. Fawcett/ Kluwer Academic Publishers, 2004- 398 p.
83. Ferreira-González, Ignacio. The epidemiology of Coronary Heart Disease/ Ignacio Ferreira-González// Spanish Review of Cardiology. - 2014. – V. 67.- I. 2. –P.1234-1242.
84. Fitterman, Nick. Brain Natriuretic Peptide Hospital Medicine Clinics Checklist/ Nick Fitterman, and Alpesh Amin// Hospital Medicine Clinics.- 2012-07-01.- V. 1.- I. 3.- P. e289-e299.
85. Folsom, A. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators/ A. Folsom, W. Rosamond, E. Shahar// Circulation.- 1999.- V. 100. P.736-742.
86. Frelinger, A. L. Clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics vary widely despite exclusion or control of polymorphisms (CYP2C19, ABCB1, PON1), noncompliance, diet, smoking, co-medications (including proton pump inhibitors), and pre-existent variability in platelet function/A.L. Frelinger, D.L. Bhatt, R.D. Lee// J Am Coll Cardiol.- 2013.- V.61.- P.872-879/
87. Freynhofer, M. Prognostic value of plasma von Willebrand factor and its cleaving protease ADAMTS13 in patients with atrial fibrillation/ M.Freynhofer, S. Gruber, V. Bruno// Int J Cardiol.- 2013.-V.168.-P.317-325.
88. Gandhi, C. ADAMTS13 deficiency exacerbates VWF-dependent acute myocardial ischemia/reperfusion injury in mice/ C.Gandhi, D. Motto, M.Jensen// Blood.-2012.-V.120.-P. 5224-5230.
89. Gandhi, C. ADAMTS13 modulates atherosclerotic plaque progression in mice via a VWF-dependent mechanism/ C.Gandhi, A. Ahmad, K. Wilson// J Thromb Haemost.-2014.-V.12.-P. 255-260.

90. Gandhi, C. ADAMTS13 reduces vascular inflammation and the development of early atherosclerosis in mice/ C. Gandhi, M. Khan, S. Lentz// *Blood*.- 2012.-V.119.- P.2385-2391.
91. Ganz, T. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia/ T. Ganz, J. Weiss// *Semin Hematol*.- 2011.- V. 34.- 343-354.
92. Gilstrap, L. Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update/ L. Gilstrap, T. Wang// *Clin Chem*.- 2012.-V.58.-P.72-82.
93. Goldenberg, N. Elevated lipoprotein (a), small apolipoprotein (a), and the risk of arterial ischemic stroke in North American children/ N. Goldenberg, T. Bernard, J. Hillhouse// *Haematologica*.- 2013.-V.98.-P.802-807.
94. Goldman, Lee. Cecil Medicine. Twenty-Fourth Edition/ Lee Goldman and Andrew I. Schafer// *Epidemiology of Cardiovascular Disease*. -2012.- P.256-262.
95. Goliash, G. Routinely available biomarkers improve prediction of long-term mortality in stable coronary artery disease: the Vienna and Ludwigshafen Coronary Artery Disease (VILCAD) risk score/ G. Goliash, M. Kleber, B. Richter// *Eur Heart J*.- 2012.- V.33.-P.2282-2289.
96. Gotto, A. Recent clinical studies of the effects of lipid- modifying therapies/ A. Gotto, J. Moon// *Am J Cardiol*.- 2012.-V.110.- P.15A- 26A.
97. Grau, A. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events/ A. Grau, A. Boddy, D. Dukovic// *Stroke*.- 2004.-V. 35.-P.1147-1152.
98. Gremmel, T. Chronic kidney disease is associated with increased platelet activation and poor response to antiplatelet therapy/ T. Gremmel, M. Muller, S. Steiner// *Nephrol Dial Transplant*.- 2013.- V.28.- P.2116-2122
99. Gremmel, T. Clinical, genetic and confounding factors determine the dynamics of the in vitro response/non response to clopidogrel/ T. Gremmel, S. Panzer// *Thromb Haemost*.- 2011.- V.106.- P.211-218
100. Gremmel, Thomas. Human neutrophil α -defensins are associated with adenosine diphosphate-inducible neutrophil-platelet aggregate formation and response to clopidogrel in patients with atherosclerosis/ Thomas Gremmel,

- Markus Durstberger, Beate Eichelberger, Renate Koppensteiner, Christoph W. Kopp, and Simon Panzer//*Translational Research*.-2014.-V.5.-P.489-495.
101. Guaní-Guerra, Eduardo Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease Eduardo Guaní-Guerra, Teresa Santos-Mendoza, Saúl O. Lugo-Reyes, and Luis M. Terán//*Clinical Immunology*. - 2010. – V.135.- I. 1.- P. 1-11.
 102. Gutstein, D. Anacetrapib, a novel CETP inhibitor: pursuing a new approach to cardiovascular risk reduction/D. Gutstein, R. Krishna, D. Johns//*Clin Pharmacol Ther*.- 2012.-V. 91.-P.109-122.
 103. Gillum, R. Counts of neutrophils, lymphocytes, and monocytes, cause-specific mortality and coronary heart disease: the NHANES-I epidemiologic follow-up study/ R. Gillum, M.Mussolino, J. Madans//*Ann Epidemiol*.- 2005.- V.15.- P. 266-271.
 104. Hanson, E. Plasma levels of von Willebrand factor in the etiologic subtypes of ischemic stroke/E. Hanson, K. Jood,S. Karlsson//*J Thromb Haemost*.- 2011.- V.9.-P.275-281.
 105. Hansson, G. The immune system in atherosclerosis/G. Hansson, A. Hermansson//*Nat Immunol*.- 2011.-V.12.-P.204-212.
 106. Harismendy, O. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response/ O.Harismendy, D. Notani, X. Song//*Nature*.- 2011.-V.470.-P.264-268.
 107. Hartaigh ó, G. Which leukocyte subsets predict cardiovascular mortality? From the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study Bríain/ ó Hartaigh, Jos A. Bosch, G. NeIL Thomas, Janet M. Lord, Stefan PILz, Adrian Loerbroks, Marcus E. Kleber,Tanja B. Grammer, Joachim E. Fischer, Bernhard O. Boehm, and Winfried März//*Atherosclerosis*. - 2012. - V. 224. - I.1. – P. 161-169.
 108. Heinrich, J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk: results from the PROCAM study in healthy men//J. Heinrich, L. Balleisen, H. Schulte// *Arterioscler Thromb*.- 1994.-V.14.- P.54-59.

109. Helgadottir, A. Apolipoprotein(a) genetic sequence variants associated with systemic atherosclerosis and coronary atherosclerotic burden but not with venous thromboembolism/ A.Helgadottir, S. Gretarsdottir, G. Thorleifsson//J Am Coll Cardiol.- 2012.- V.60.-P.722-729.
110. Helwig, B. Increased interleukin-6 receptor expression in the paraventricular nucleus of rats with heart failure/ B.Helwig, T. Musch// Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.- 2007.- V. 292.- P. R1165—R1173.
111. Henriksen, P. Therapeutic inhibition of tumour necrosis factor α in patients with heart failure: cooling an inflamed heart/ P.Henriksen, D. Newby// Heart.- 2003.- V. 89. -P. 14—18.
112. Hense, H. Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany - results from the MONICA Augsburg and the PROCAM cohorts/ H.Hense, H. Schult, H. Lowel// Eur. Heart J.- 2003. - V.24. -№10.- P.937-945.
113. Higazi, A. Defensin stimulates the binding of Lp(a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells/A. Higazi, E. Lavi, K. Bdeir//Blood.- 1997.- V.89.-P. 4290-4298.
114. Higazi, A. Defensin stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis/ A.Higazi, T. Nassar, T. Ganz//Blood.- 2000.- V.100.- P.4026-4032.
115. Hingorani, A. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a Mendelian randomisation analysis/A. Hingorani, J. Casas//Lancet.- 2012.-V.379.-P.1214-1224.
116. Hingorani, A. Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL6R MR) Consortium : The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a Mendelian randomisation analysis/ A. Hingorani,J. Casas //Lancet.- 2012.-V.379.-P.1214-1224.

117. Holdt, L. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations/L. Holdt, D. Teupser// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*- 2012.-V.32.- P.-196-206.
118. Hopewell, J. Lipoprotein(a) genetic variants associated with coronary and peripheral vascular disease but not with stroke risk in the Heart Protection Study/J. Hopewell, R. Clarke, S. Parish//*Circ Cardiovasc Genet.*- 2011.-V. 4.- P.68-73.
119. Hoyer, F. Microparticles—messengers of biological information/ F.Hoyer, G. Nickenig, N. Werner// *J Cell Mol Med.*- 2010.-V.14.- P.2250-22566.
120. Huo Y. Trends in Cardiovascular Medicine/ Y. Huo and L. Xia.- 2009.- V. 19.- I. 4.- P. 140-145.
121. Hyattsville, MD. National Center for Health Statistics : Health, United States, 2011: with special feature on socioeconomic status and health/MD. Hyattsville// <http://www.cdc.gov/nchs/hus.htm>.- 2012.
122. Hyseni, A. Chronic dysfunction of the endothelium is associated with mortality in acute coronary syndrome patients/ A.Hyseni, M. Roest, S. Braun//*Thromb Res.*- 2013.-V.131.-P. 198-203.
123. Ikeda, N. A slightly elevated level of N-terminal pro-brain natriuretic peptide can predict coronary artery disease in a population with normal left ventricular function/N. Ikeda, M. Nakamura, Y. Yazaki//*Heart Vessels.*- 2011.- V.26. P.473-479.
124. Ito, M. Management of familial hypercholesterolemias in adult patients: recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia/ M.Ito, M. McGowan, P. Moriarty//*J Clin Lipidol.*- 2011.- V.5.- P.38-45.
125. Jacobi, J. Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury/ J.Jacobi, S. Sela, H. Cohen//*Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2006.- V. 290.-P. H2051-H2058.

126. Jacobson, Terry. A. Lipoprotein(a), Cardiovascular Disease, and Contemporary Management//Mayo Clinic Proceedings.- 2013.- V.88.- I.11.- P.1294-1311.
127. Jameson, J. Larry. Endocrinology , Sixth Edition/ J. Larry Jameson, and Leslie J. De.- Copyright © 2011, 2006, 2001, 1995, 1989, 1979 by Saunders, an affiliate of Elsevier.- Groot Chapter 111.- Hormones of the Cardiovascular System. -P. 2036-2052.
128. Jin, S. Genetic ablation of Adamts13 gene dramatically accelerates the formation of early atherosclerosis in a murine model/ S.Jin, J. Tohyama, R. Bauer// Arterioscler Thromb Vasc Biol.- 2012.-V.32.-P.1817-1823.
129. Joseph, G. Plasma alpha-defensin is associated with cardio-vascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients/ G.Joseph, L. Tarnow, A. Astrup//J. Clin. Endocrinol. Metab.- 2008.-V. 93.- P.1470-1475.
130. Kalendar, R. Java Web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis/R. Kalendar, D. Lee, A.Schulman. - 2011.
131. Kameda, T. Determination of myeloperoxidase-induced apoAI-apoAII heterodimers in high-density lipoprotein/T. Kameda, Y. Usami, S. Shimada//Ann Clin Lab Sci.- 2012.-V.42.-P.384-391.
132. Kamstrup, P. Extreme lipoprotein(a) levels and improved cardiovascular risk prediction/ P. Kamstrup, A. Tybjaerg-Hansen, B. Nordestgaard//J Am Coll Cardiol.- 2013.-V.61.-P.1146-1156.
133. Kaptoge, S. Emerging Risk Factors Collaboration: C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction / S.Kaptoge, E. Di Angelantonio// N Engl J Med.- 2012.-V.367.- P.1310-1320.
134. Karatela, Rubina. Interrelationships of factor VII activity and plasma leptin with insulin resistance in coronary heart disease/ Rubina A. Karatela, and Gurmukh S. Sainani//Atherosclerosis.- 2010.- V. 209.- I. 1.- P. 235-240.
135. Kasama, S. Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction/ S. Kasama, M. Furuya, T. Toyama//Eur Heart J.- 2008.-V. 29.- P.1485-1494.

136. Kavousi, M. Evaluation of newer risk markers for coronary heart disease risk classification: a cohort study/ M.Kavousi, S. Elias-Smale, J. Rutten//Ann Intern Med.-2012.-V.156.-P.438-444.
137. Khan, M. ADAMTS13 reduces VWF-mediated acute inflammation following focal cerebral ischemia in mice/ M. Khan, D. Motto, S. Lentz//J Thromb Haemost.-2012.-V.10.- P.1665-1671.
138. Koenig, W. Inflammation and coronary heart disease: an overview/ W. Koenig// Cardiol Rev.- 2001.- V.9(1).- P.31-35.
139. Koenig, W. High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: From improved risk prediction to risk-guided therapy/W. Koenig//International Journal of Cardiology.-2013.-V.168.-I.6.-P. 5126-5134.
140. Kolasa-Trela, R. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is elevated in patients with severe aortic valve stenosis without clinically overt atherosclerosis/R. Kolasa-Trela, K. Fil, M. Bazanek//Clin Chem Lab Med.- 2012.-V.50.-P.1825-1831.
141. Kolski, B. Emerging therapeutic agents to lower lipoprotein (a) levels /B. Kolski B, S. Tsimikas//Curr Opin Lipid.- 2012.- V.23.- V.560-568.
142. Konerman, M. Lipoprotein(a) particle concentration and lipoprotein(a) cholesterol assays yield discordant classification of patients into four physiologically discrete groups/ M.Konerman, K. Kulkarni, P. Toth// J Clin Lipidol.- 2012.-V.6.-P.368-373.
143. Kougias, P. Neutrophil antimicrobial peptide alpha-defensin causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries/ P.Kougias, H. Chai, P. Lin//J. Vasc. Surg.- 2006.-V.43.-P.357-363.
144. Krauss, R. Changes in lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy individuals treated with the CETP inhibitor anacetrapib/ R. Krauss, K. Wojnooski, J. Orr// J Lipid Res.- 2012.-V.53.-P.540-547.
145. Kronenberg, F. Lipoprotein(a): resurrected by genetics/F. Kronenberg, G.Utermann//J Intern Med.- 2013.-V.273.-P.6-30.

146. Krušinová, Eva. Fatty acid binding proteins in adipose tissue: A promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis?/Eva, Krušinová, and Terezie Pelikánová// *Diabetes Research and Clinical Practice*.- 2008.- V. 82.- Supplement 2.- P. S127-S134.
147. Lahoute, C. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets/C. Lahoute, O. Herbin, Z. Mallat//*Nat Rev Cardiol*.- 2011.- V.8.-P.348-358.
148. Lambers, M. Role of reduced ADAMTS13 in arterial ischemic stroke: a pediatric cohort study/ M.Lambers,N. Goldenberg,G. Kenet// *Ann Neurol*.-2013.- V.73.-P.58-64.
149. Lamon-Fava, S. Lipoprotein(a) levels, apo(a) isoform size, and coronary heart disease risk in the Framingham Offspring Study/ S. Lamon-Fava, S. Marcovina, J. Albers// *J Lipid Res*.- 2011.-V.52.-P. 1181-1187.
150. Langlois, M. Laboratory approaches for predicting and managing the risk of cardiovascular disease: postanalytical opportunities of lipid and lipoprotein testing/ M. Langlois//*Clin Chem Lab Med*.- 2012.-V.50.-P.1169-1181.
151. Lavie, C. Niacin therapy lives for another day—maybe?/C. Lavie, J. DiNicolantonio, R. Milani// *J Am Coll Cardiol*.- 2013.-V.61.-P.2197-2198.
152. Lavigne, P. The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression/P. Lavigne, R. Karas//*J Am Coll Cardiol*.- 2013.-V. 61.- P.440-446.
153. Levi, Marcel. Conflict of Interest Statement. The authors declare no conflict of interest. The Coagulant Response in Sepsis/ Marcel Levi//*Clinics in Chest Medicine*.- 2008.-V. 29.-I.4.- P. 627-642.
154. Li, M. Tobacco smoke induces the generation of procoagulant microvesicles from human monocytes/macrophages/ M. Li, D. Yu, K. Williams//*Arterioscler Thromb Vasc Biol*.- 2010.- V.30.-P.1818-1824.
155. Li, Y. Genetic variants in the apolipoprotein(a) gene and coronary heart disease/ Y.Li, M. Luke, D. Shiffman//*Circ Cardiovasc Genet*.- 2011.-V.4.- P.565-573.

156. Liao, X. Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein A-I/
X. Liao, B. Lou, J. Ma//Life Sci.- 2005.- V.77.- P.325-335.
157. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis/ P. Libby//Arterioscler Thromb
Vasc Biol.- 2012.- V.32.-P.2045-2051.
158. Libby, P. Progress and challenges in translating the biology of
atherosclerosis/ P. Libby, P. Ridker, G. Hansson// Nature.- 2011.- V.473.- P.317-
325.
159. Liu, Y. TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and
may be a therapeutic target/Y. Liu, H. Yu, Y.Zhang// Med. Hypotheses.- 2008.-
V.70.- P.314-316.
160. Liuzzo, G. C-reactive protein directly induces the activation of the
transcription factor NFκB in human monocytes: a clue to pathogenesis of acute
coronary syndromes? (Abstr.)/ G. Liuzzo, C.Colussi, F. Ginnetti// Eur. Heart J. –
2001. – Vol. 22 (Suppl.). – P. 372.
161. Lord, S. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability/S.
Lord//Arterioscler Thromb Vasc Biol.- 2011.-V.31.-P.494-499.
162. Mañ, K.: Selective upregulation of cardiac brain natriuretic pep-tide at the
transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by
conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP
kinase/K. Mañ, T. Ogawa// J Mol Cell Cardiol.- 2004.-V.36.- P. 505-513.
163. Maisel, A. S. Japanese-Western consensus meeting on biomarkers/A. S.
Maisel, K. Nakao, P. Ponikowski// International Heart Journal.- 2011.-V.52.-
P.253-265.
164. Master, S. Beyond LDL cholesterol in assessing cardiovascular risk: apo B
or LDL-P?/ S. Master, D. Rader//Clin Chem.- 2013.-V.59.-P.723-725.
165. Mathew, Geetha. A multimodal Darwinian strategy for alleviating the
atherosclerosis pandemic/Geetha Mathew, Magith Thambi, and M.K.
Unnikrishnan// Medical Hypotheses.- 2014.-V.-82.-I. 2.- P.159-162

166. Mazor, R. Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients/ R. Mazor, R. Shurtz-Swirski, R. Farah//*Atherosclerosis*.- 2008.- V. 197. –P. 937-943.
167. McEntegart, M.. Increase in serum adiponectin concentration in patients with heart failure and cachexia: relationship with leptin, other cytokines, and B-type natriuretic peptide/ M.McEntegart, B. Awede, M. Petrie// *Eur. Heart J.*- 2007.- V. 28.- P. 829—835.
168. McKenney, J. Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy/ J. McKenney, M. Koren, D. Kereiakes//*J Am Coll Cardiol.*- 2012.- V. 59.-P. 2344-2353.
169. McMahan, C. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Research Group. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis/ C. McMahan, S. Gidding, G. Malcom, R. Tracy, J. Strong, H. McGILL// *Pediatrics*.- 2006.- V.118(4).- P. 1447- 1455.
170. McPherson, Ruth. Inflammation and Coronary Artery Disease: Insights From Genetic Studies/Ruth McPherson, and Robert W. Davies//*Canadian Journal of Cardiology*.- 2012.-V.28.-I.6. –P. 662-666.
171. Meng, Xiangzhi. Heart fatty acid binding protein as a marker for postmortem detection of early myocardial damage/Xiangzhi Meng, Mei Ming, and Enyin Wang// *Forensic Science International*.-2005 – V.96.-P.1234-1241.
172. Merki, E. Antisense oligonucleotide lowers plasma levels of apolipoprotein (a) and lipoprotein (a) in transgenic mice / E. Merki, M. Graham, A. Taleb// *J Am Coll Cardiol.*- 2011.-V.57.- P.1611-1621.
173. Michelle, A.H. Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis/A.H.Michelle- Sonneveld, P.M. Moniek, de Maat, and W.G.Frank// *Leebeek Blood Reviews*. - 2014. – V. 28.- I.4.- P. 167-178.

174. Mistry, S.K. Differential expression and synthesis of natriuretic peptides determines natriuretic peptide receptor expression in primary cultures of human proximal tubular cells/ S.K. Mistry, G.M. Hawksworth, A.D.Struthers//Journal of Hypertension.- 2001.- V.19.- P. 255-262.
175. Mora, S. The clinical utility of high-sensitivity C-reactive protein in cardiovascular disease and the potential implication of JUPITER on current practice guidelines/ S. Mora, K. Musunuru, R. Blumenthal//Clin Chem .-2009.- V.55.- P.219-228.
176. Moreno, J. In vitro and in vivo evidence for the role of elastase shedding of CD163 in human atherothrombosis/ J.Moreno, A. Ortega-Gomez, S. Delbosc//Eur Heart J.- 2012.-V. 33.-P.252-263.
177. MRC/Cancer Research UK/BHF Clinical Trial Service Unit & Epidemiological Studies Unit, Nuffield Department of Clinical Medicine, Medical Sciences Division, Oxford University. HPS2-THRIVE: Preliminary results. January 2013. University of Oxford CTSU website. INTER REF <http://www.ctsu.ox.ac.uk/hps2-thrive/index.htm>. Updated May 2, 2013.
178. Naitza, S. A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in Sardinians reveals associations that underpin its complex regulation/ S.Naitza, E. Porcu , M. Steri// PLoS Genet.- 2012.- V.8.- P.1002-1009.
179. Nasr, Nathalie. Association of neutrophil count with microembolization in patients with symptomatic carotid artery stenosis/ Nathalie Nasr, Jean Bernard Ruidavets, Jean François Arnal, Pierre Sie, and Vincent Larrue// Atherosclerosis.- 2009.- V. 207. – I. 2.- P. 519-523.
180. Nassar, Hisham. α -Defensin: Link between inflammation and atherosclerosis/ Hisham Nassar, Ehud Lavi, Sa'ed Akkawi, Khail Bdeir, Samuel N. Heyman, P.N. Raghunath, John Tomaszewski, and Abd Al-Roof Higazi//Atherosclerosis.- 2007.- V. 194.- I.2.- P.452-457.

181. Navasiolava, N. M. NT-ProBNP levels, water and sodium homeostasis in healthy men: Effects of 7 days of dry immersion/ N.M.Navasiolava, A. Pajot, Y. Gallois// *European Journal of Applied Physiology*.- 2011.- V.111.- P.2229-2237.
182. Nijm, J. Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease/J. Nijm, A. Wikby, A. Tompa// *Am J Cardiol*.- 2005.- V. 95. –P. 452-456.
183. Nordestgaard, B. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status/ B.Nordestgaard, M. Chapman, K. Ray//*Eur Heart J*. – 2010. – V. 31. –P. 2844-2853.
184. O'Donoghue, M. Study design and rationale for the Stabilization of pLaques using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction (SOLID-TIMI 52) trial in patients after an acute coronary syndrome/M. O'Donoghue, E. Braunwald, H. White// *Am Heart J*.- 2011.-V.162.- P.613-619.
185. O'Donoghue, Michelle L. Lipoprotein(a) for Risk Assessment in Patients With Established Coronary Artery Disease/Michelle L. O'Donoghue, David A. Morrow, Sotirios Tsimikas, Sarah Sloan, Angela F. Ren, Elaine B. Hoffman, Nihar R. Desai, Scott D. Solomon, Michael Domanski, Kiyohito Arai, Stephanie E. Chiuve, Christopher P. Cannon, Frank M. Sacks, and Marc S. Sabatine//*JACC*.-2014.-V.63- P. 520-527.
186. Omicron, H. Evaluation of 9 biomarkers for predicting 10-year cardiovascular risk in patients undergoing coronary angiography: findings from the LUdwigshafen RIsk and Cardiovascular Health (LURIC) study/ H.Omicron, G. Thomas, J. Bosch// *Int J Cardiol*.- 2013.-V.168.-P.2609-2615.
187. Orekhov, A.N. Dissociated cells from different layers of adult human aortic wall/ AN.Orekhov, ER. Andreeva, VV. Tertov//*Acta Anat (Basel)*. – 1984.- V.119(2).- P.99-105.
188. Owens, A. Microparticles in hemostasis and thrombosis/A. Owens, N. Mackman// *Circ Res*.- 2011. –V. 108. –P. 1284-1297.

189. Palla, R. Evaluation of assay methods to measure plasma ADAMTS13 activity in thrombotic microangiopathies/R. Palla, C. Valsecchi, M.Bajetta//*Thromb Haemost.*-2011.-V.105.-P.381-385.
190. Peden, J. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease/J. Peden, J. Hopewell, D. Saleheen D//*Nat Genet.*- 2011.-V.43.-P.339-344.
191. Penn, M. Macromolecular transport in the arterial intima: comparison of chronic and acute injuries/ M.Penn, S. Rangaswamy, G. Saidel//*Am J Physiol.*- 1997.- V.272(4 Pt 2). -P. 1560-1570.
192. Perk, J. The fifth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)/ J.Perk, G. De Backer, H. Gohlke//*Eur Heart J.*- 2012.- V.33.-P.1635-1701.
193. Plaimauer, B. Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies/B. Plaimauer, H. Kremer Hovinga, C. Juno C//*J Thromb Haemost.*- 2011.-V. 9.-P.936-944.
194. Prnjavorac, B. Use of amino-terminal pro-B type natriuretic peptide as the parameter for long-term monitoring of water overload in patient with chronic kidney diseases/B. Prnjavorac, K. Abduzaimović, J. Jukić// *Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona.*- 2011.-V.8.- P.116-120.
195. Pillay, J. In vivo labeling with $^2\text{H } ^{20}\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days/ J.Pillay, I. den Braber, N.Vrisekoop// *Blood.*- 2011.- V.116.- P. 625-627.
196. Raposo, G. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends/ G. Raposo, W. Stoorvogel//*J Cell Biol.*- 2013.- V.200.- P.373-383.
197. Rautou, P. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration/ P.Rautou, A. Leroyer, B. Ramkhelawon// *Circ Res.*- 2011.- V.108.- P. 335-343.

198. Reilly, M. Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies/ M.Reilly, M.Li//Lancet.- 2011.-V.377.-P.383-392.
199. Rekhter, MD Three-dimensional cytoarchitecture of normal and atherosclerotic intima of human aorta/ MD.Rekhter, ER. Andreeva, AA. Mironov, AN. Orekhov// Am J Pathol. - 1991. -V.138(3).-P. 569-580.
200. Ridker, P. Interleukin-1 β inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS)/ P. Ridker, T. Thuren, A. Zalewski //Am Heart J .-2011.-V.162.- P. 597-605.
201. Ridker, P. C-reactive protein in the Heart Protection Study/ P.Ridker, W. Koenig, J.Kastelein//Lancet.- 2011.-V.377.-P.1918-1919.
202. Ridker, PM. On behalf of the CANTOS Pilot Investigative Group. Effects of Interleukin-1 p Inhibition With Canakinumab on Hemoglobin A1c, Lipids, C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Fibrinogen: A Phase IIb Randomized, Placebo-Controlled Trial// PM. Ridker, CP.Howard, V.Walter, B. Everett, P. Libby,J. Hensen, T.Thuren// Circulation.- 2012.- V.126(23).- P.2739-2748.
203. Rietzschel, E. High-sensitive C-reactive protein: universal prognostic and causative biomarker in heart disease?/ E.Rietzschel, M. De Buyzere//Biomark Med.- 2012.-V.6.-P.19-34.
204. Rodger, E. Proteomic analysis of aortae from human lipoprotein(a) transgenic mice shows an early metabolic response independent of atherosclerosis/E. Rodger, R.Suetani, G. Jones// PLoS One.- 2012.-V.7.-P. 76-83.
205. Roger, V. Heart disease and stroke statistics–2012 update: a report from the American Heart Association/ V.Roger, A. Go, D. Lloyd-Jones//Circulation.- 2012.-V.125.-P. 202-220.
206. Romanov, Y. A. Endothelial heterogeneity and intimal blood-borne cells. Relation to human atherosclerosis/ YA.Romanov, IV.Balyasnikova, VB. Bystrevskaya//Ann N Y Acad Sci.- 1995.- V. 17(748).- P.12-37.

207. Roque, M. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils/ M.Roque, J.Fallon, J. Badimon//*Arterioscler Thromb Vasc Biol.*- 2000.- V.20.- P. 335-342.
208. Rose, R. Iron overload decreases CaV1.3-dependent L-type Ca²⁺ currents leading to bradycardia, altered electrical conduction, and atrial fibrillation/ R. Rose, M. Sellan, J. Simpson//*Circ Arrhythm Electrophysiol.*- 2011.-V.4.-P. 733-742.
209. Ross, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease/ R. Ross//*N Engl J Med.* – 1999. –V. 340. – P. 115-126.
210. Ross, R. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. Endothelial cell dysfunctions/ R. Ross, M Simionescu, N. Simionescu// Plenum Press, New York.- 1992.-V.3. –P. 295-307.
211. Rubina, A Interrelationships of factor VII activity and plasma leptin with insulin resistance in coronary heart disease/ Rubina A. Karatela, and Gurmukh S. Sainani //Atherosclerosis.- 2010. – V. 209.- I. 1.- P. 235-240.
212. Rudiger, A. Comparable increase of B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure/ A. Rudiger, S. Gasser, M. Fischler// *Crit Care Med.*- 2006. –V. 34. – P. 2140-2144.
213. Rudiger, Alain. In critically ill patients, B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP levels correlate with C-reactive protein values and leukocyte counts/Alain Rudiger, Manuel Fischler, Paul Harpes, Stephan Gasser, Thorsten Hornemann, Arnold von Eckardstein, and Marco Maggiorini// *International Journal of Cardiology.* – 2008. – V. 126. – I. 1. - P. 28-31.
214. Rudolf, Joseph. Cholesterol, Lipoproteins, High-sensitivity C-reactive Protein, and Other Risk Factors for Atherosclerosis/ Joseph Rudolf, and Kent B. Lewandrowski// *Clinics in Laboratory Medicine.*- 2014.- V. 34.- I. 1.- P.-113-127.

215. Sanders, Y. Reduced prevalence of arterial thrombosis in von Willebrand disease/ Y.Sanders, J. Eikenboom, E. de Wee// *J Thromb Haemost.*-2013.-V.11.- P.845-854.
216. Sanz, Javier. The Year in Atherothrombosis/ Javier Sanz and Valentin Fuster// *JACC (Journal of the American College of Cardiology)*. – 2011. – V. 58. – I. 8. – P. 779-791.
217. Sarwar, N. Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration: Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies/ N. Sarwar, A. Butterworth// *Lancet.*- 2012.-V.379.- P.1205-1213.
218. Sarwar, N. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies/ N.Sarwar, A. Butterworth, D. Freitag// *Lancet.*- 2012.-V.379.- P.1205-1213.
219. Schaub, N. Markers of plaque instability in the early diagnosis and risk stratification of acute myocardial infarction/N. Schaub, T. Reichlin, C. Meune// *Clin Chem.*- 2012.-V.58.-P. 246-256.
220. Schiviz, A. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13/A. Schiviz, K. Wuersch, C. Piskernik// *Blood.*-2012.-V.119.-P.6128-6135.
221. Schoneveld, A. H. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness/ A.H. Schoneveld, I. Hoefler, J.P.G. Sluijter, J.D. Laman, D.P.V. de Kleijn, and G. Pasterkamp// *Atherosclerosis.*- 2008.-V.197.- I. 1.- P. 95-104.
222. Schunkert, H. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease/ H.Schunkert, I. Konig, S. Kathiresan// *Nat Genet.*- 2011.-V.43.-P.333-338.
223. Semple, J.W. Platelets and the immune continuum/ J.W.Semple, J.E. Italiano, J. Freedman// *Nat Rev Immunol.*- 2011.- V.11.- P.264-274.
224. Sever, P. Evaluation of C-reactive protein prior to and on-treatment as a predictor of benefit from atorvastatin: observations from the Anglo-Scandinavian

- Cardiac Outcomes/ P. Sever, N. Poulter, C.Chang//*Trial*. *Eur Heart J*.- 2012.- V.33.-P.486-494.
225. Shaw, Albert C. Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging// Albert C. Shaw, Alexander Panda, Samit R. Joshi, Feng Qian, Heather G. Allore, and Ruth R. Montgomery// *Ageing Research Reviews*.- V. 2011.- V. 10.- I. 3. –P. 346-353.
226. Shea, J. Comparing strategies to fine-map the association of common SNPs at chromosome 9p21 with type 2 diabetes and myocardial infarction/ J.Shea, V. Agarwala, A. Philippakis//*Nat Genet*.-2011.-V.43.-P.801-805.
227. Shibata, N. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis/ N.Shibata, C.Glass // *J Lipid Res*. – 2009.- V. 50.-P. 277-281.
228. Siekmeier, R. Variation of Lp(a) plasma concentrations in health and disease/ R. Siekmeier, H. Scharnagl, G. Kostner// *Open Clin Chem J*.- 2010. –V. 3.-P. 72-79.
229. Silva, M. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation/M. Silva//*J Leukoc Biol*.-2011.-V.89.-P.675-683.
230. Sima, A. Vascular endothelium in atherosclerosis/A.Sima, C. Stancu, M. Simionescu// *Cell Tissue Res*.- 2009.- V. 335.- P. 191-203.
231. Sobenin, I. Mitochondrial mutations are associated with atherosclerotic lesions in the human aorta/ I. Sobenin, M. Sazonova, A. Postnov//*AN. Clin Dev Immunol*. – 2012.- V. 212. – P. 432 - 444.
232. Sobenin, I.A. Mutation C3256T of mitochondrial genome in white blood cells: novel genetic marker of atherosclerosis and coronary heart disease / I.A.Sobenin, M.A. Sazonova MA, M.M. Ivanova// *PLoS ONE*.—2012.- V. 7(10).- P.465-473.
233. Soloperto, G. Progress in atherosclerotic plaque imaging/ G. Soloperto, S. Casciaro//*World J Radiol*. – 2012. – V. 4(8). – P. 353-371.

234. Sonneveld, M. Relationship of Von Willebrand Factor with carotid artery and aortic arch calcification in ischemic stroke patients/M. Sonneveld, A. van Dijk, E. van den Herik//*Atherosclerosis*.- 2013.-V.230.-P.210-215.
235. Sonneveld, Michelle A.H Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis/Michelle A.H. Sonneveld, Moniek P.M. de Maat, and Frank W.G. Leebeek//*Blood Reviews*.- 2014.-V.28.-I.4.-P.167-178.
236. Springer, Jeremy. The natriuretic peptides BNP and CNP increase heart rate and electrical conduction by stim-ulating ionic currents in the sinoatrial node and atrial myocardium following activation of guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors// Jeremy Springer, John Azer, Rui Hua, Courtney Robbins, Andrew Adamczyk, Sarah McBoyle, Mary Beth Bissell, and Robert A.//*Rose Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. -2012.- V.52.- I. 5.- P. 1122-1134.
237. Stary, H. C. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults/ HC. Stary//*Arteriosclerosis*.- 1989.- V.9(1 Suppl). – P. 119-132.
238. Staub, D. Use of B-type natriuretic peptide to predict blood pressure improvement after percutaneous revascularisation for renal artery stenosis/D. Staub, T. Zeller, D. Trenk// *European Journal of Vascular Surgery*. – 2010. – V. 40. – P. 599-607.
239. Stein, E. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol/E. Stein,S. Mellis, G. Yancopoulos//*N Engl J Med*.- 2012.-V.366.-P.1108-1118.
240. Stein, E. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) measurements: mass, activity, but little productivity/E. Stein//*Clin Chem*.- 2012.-V.58.-P.814-817.
241. Stemerman, M. Vascular injury: platelets and smooth muscle cell response/ M. Stemerman//*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. - 1981. – V. 294(1072). – P. 217-224.
242. Sugano, R. Polymorphonuclear leukocytes may impair endothelial function: results of crossover randomized study of lipid-lowering therapies/R.

- Sugano, H. Matsuoka, N. Haramaki // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005.- V. 25.- P.1262-1267.
243. Sunderkotter, C. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response/C. Sunderkotter, T. Nikolic, M. Dillon// *J Immunol.*- 2004.- V.172.- P.4410-4417.
244. Silveira, Angela. Relationships of plasma factor VIIa-antithrombin complexes to manifest and future cardiovascular disease// Angela Silveira, Daniela Scanavini, Susanna Boquist, Carl-Göran Ericsson, Mai-Lis Hel-lénus, Karin Leander, Ulf de Faire, John Öhrvik, Barry Woodhams, James H. Morrissey, and Anders Hamsten// *Thrombosis Research.*- 2012. – V.130.- I. 2.- P. 221-225.
245. Tedgui, A. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways/ A. Tedgui, Z. Mallat// *Physiol Rev.* – 2006. –V. 86.- P.515-581.
246. Thanassoulis, G. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis/ G.Thanassoulis, C. Campbell, D. Owens// *N Engl J Med.*- 2013.-V.368.- P.503-512.
247. Thomas, A. Smooth muscle cells of injured rat and rabbit arteries in culture: contractile and cytoskeletal proteins/ A. Thomas, J. Campbell// *Atherosclerosis.* – 2001. – V. 154(2). – P. 291-299.
248. Tousoulis, Dimitris. Differences in inflammatory and thrombotic markers between unstable angina and acute myo-cardial infarction/ Dimitris Tousoulis, Charalambos Antoniades, Erini Bosinakou, Maria Kotsopoulou, Costas Tsoufis, Kyriakoula Marinou, Marietta Charakida, Elli Stefanadi, Manolis Vavuranakis, George Latsios, and Christodoulos Stefanadis// *International Journal of Cardiology.* -2007. –V. 115. – I.2. – P. 203-207.
249. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC) on Management of Peripheral Arterial Disease (PAD) // *J. Vasc. Sur.* - 2007. - Vol. 45. - Suppl. 1. - P. 5-67.

250. Tsimikas, S. Effect of mipomersen on lipoprotein(a) in patients with hypercholesterolemia across four phase III studies/ S. Tsimikas, J. Witztum, A. Catapano// *J Am Coll Cardiol.*- 2012.- V.59.- P.1494.
251. Turner, J. Assessment of oxidative stress in lymphocytes with exercise/ J. Turner, J. Bosch, M. Drayson// *J Appl Physiol.*- 2011.-V.111.-P.206-211.
252. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group// *J.A.M.A.*- 1999.- V.281.- №21. P.2005-2012.
253. Undas, A. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases/ A.Undas, R. Ariens// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*- 2011.-V.31.-P.e88-e99.
254. Undas, A. Acquired dysfibrinogenemia in atherosclerotic vascular disease/ A.Undas// *Pol Arch Med Wewn.*-2011.-V.121.-P.310-319.
255. US Preventive Services Task Force. Menopausal Hormone Therapy for the Primary Prevention of Chronic Conditions: Clinical Summary of US Preventive Services Task Force Recommendation. AHRQ Publication No. 12-05168-EF-4. INTER REF <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf12/menohrt/menohrtsum.htm>. Published October 2012. Accessed September 15, 2013.
256. Van Biesen, W. Fluid status in peritoneal dialysis patients/ W. Van Biesen, J. Williams, A. Covic// *The European Body Composition Monitoring (EuroBCM) study cohort. PLoS One.*- 2011.- V.6.- P.1714-1718.
257. Van Galen, K. Von Willebrand factor deficiency and atherosclerosis/ K. Van Galen, A. Tuinenburg, E. Smeets// *Blood Rev.*- 2012.-189-196.
258. Van Leeuwen, M. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. / M. Van Leeuwen, M. Gijbels, A. Duijvestijn// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008.- V. 28. – P.84-89.
259. Van Loon, J. Prognostic markers in young patients with premature coronary heart disease/ J. Van Loon, M. de Maat, J. Deckers// *Atherosclerosis.*- 2012.-V.224.-P.213-217.

260. Van Loon, J. von Willebrand factor plasma levels, genetic variations and coronary heart disease in an older population/ J.Van Loon, M. Kavousi, F. Leebeek// *J Thromb Haemost.*- 2012- V.10.-P.1262-1269.
261. Van Loon, J.Relationship between thrombospondin gene variations, von Willebrand factor levels and the risk of coronary heart disease in an older population/J. Van Loon, M. de Maat, A. Hofman// *J Thromb Haemost.*- 2011.- V.9.-P.1415-1417.
262. Van Oostrom, A. Effects of rosuvastatin on post-prandial leukocytes in mildly hyperlipidemic patients with premature coronary sclerosis/M. Van Leeuwen, M. Gijbels, A. Duijvestijn//*Atherosclerosis.* – 2006. – V.185. – P. 331-339.
263. Van Schie, M. Genetic determinants of von Willebrand factor levels and activity in relation to the risk of cardiovascular disease: a review/ M. Van Schie,J. Van Loon, M. de Maat//*J Thromb Haemost.*-2011.-V.9.-P. 899-908.
264. Van Schie, M. Genetic determinants of von Willebrand factor plasma levels and the risk of stroke: the Rotterdam Study/ M.Van Schie, R. Wieberdink, P. Koudstaal//*J Thromb Haemost.*- 2012.-V.10.-P.550-556.
265. Vanhoutte, P. Endothelial dysfunction/ P.Vanhoutte// *Circ J.* – 2009.- V.73.- P.595-601.
266. Virani, S. Associations between lipoprotein(a) levels and cardiovascular outcomes in black and white subjects: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study/ S. Virani, A. Brautbar, B. Davis//*Circulation.*- 2012.-V.125.- P.241-249.
267. Wang, H. Core2 1-6- N-glucosaminyltransferase-I deficiency protects injured arteries from neointima formation in apoE-deficient mice/ H.Wang, W. Zhang, R. Tang// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. –V. 29.- P. 1053-1059.
268. Wang, J. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1beta-dependent manner/J. Wang, J. Williams, B. Davis// *Blood.* – 2011.- V.118. –P. 2366-2377.

269. Wang, Jian-Guo. Leukocyte-Derived Microparticles as Proinflammatory Mediators in Atherosclerosis /Jian-Guo Wang, Elena Aikawa, and Masanori Aikawa//JACC.- 2013.- V. 62.- I.16.- P. 1442-1445.
270. Wannamethee, S. Fibrin D-dimer, tissue-type plasminogen activator, von Willebrand factor, and risk of incident stroke in older men/ S.Wannamethee, P. Whincup,L. Lennon//Stroke.- 2012.-V.43.-P.1206-1211.
271. Weber, C. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options/C Weber, H Noels//Nat Med.- 2011.-V.17.-P.1410-1422.
272. Weber, C. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models/C. Weber, A. Zernecke, P. Libby//Nat Rev Immunol.- 2008.- V.8.- P. 802-815.
273. Wennberg, P. Haemostatic and inflammatory markers are independently associated with myocardial infarction in men and women/ P.Wennberg, F. Wensley, E. Di Angelantonio//Thromb Res.- 2012.-V.129.-P.68-73.
274. Wheeler, J. Associations between differential leucocyte count and incident coronary heart disease: 1764 incident cases from seven prospective studies of 30 374 individuals/ J. Wheeler, M. Mussolino, R. GILlum//Eur Heart J.- 2004.- V. 25.- P.1287-1292.
275. Whitehead, J. The Design and Analysis of Sequential Clinical Trials, revised 2nd/ J.Whitehead. - Revised 2n ,1997. – 487 p.
276. Witthaut, R. Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction/ R. Witthaut, C. Busch, P. Fraunberger//Intensive Care Med.- 2003.- V. 29.- P.1696-1702.
277. Willeit, P. Hemostatic factors and risk of coronary heart disease in general populations: new prospective study and updated meta-analyses/ P. Willeit, A. Thompson, T. Aspelund//PLoS ONE.- 2013.- V. 8.- P. 55-75.
278. Yan, Z. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis/Z. Yan, G. Hansson // Immunol Rev. – 2007.- V. 219. – P. 187-203.

279. Yousuf, O. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link?/ O.Yousuf, B. Mohanty, S.Martin//J Am Coll Cardiol.- 2013.-V.62.-P.397-408.
280. Zairis, M. The impact of plasma levels of C-reactive protein, lipoprotein (a) and homocysteine on the long-term prognosis after successful coronary stenting: the Global Evaluation of New Events and Restenosis After Stent Implantation Study/ M.Zairis, J. Ambrose, S. Manousakis// J Am Coll Cardiol. – 2002.- V.40.- P. 1375-1382.
281. Zeller, T. Genomewide association studies in cardiovascular disease—an update 2011/ T.Zeller, S. Blankenberg, P.Diemert//Clin Chem.- 2012.-V.58.- P.92-103.
282. Zernecke, A. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis/ A. Zernecke, I. Bot, Y. Djalali-Talab// Circ Res. – 2008.- V. 102. – P. 209-217.
283. Zhou, Y. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of the restenosis after coronary atherectomy/ Y. Zhou, M. Leon, M. Walcawiw// N. Engl. J. Med. - 1996.- Vol. 335.-P. 624- 630.
284. Zhu, Qiwei. Prospective monitoring N-terminal pro-brain natriuretic peptide during natural progression of atherosclerotic renal artery stenosis in elderly/Qiwei Zhu, Ningyu An, Yongyi Bai, Ning Zhu, and Meihua Li//Archives of Gerontology and Geriatrics.- 2013.- V. 56.- I.2.- P. 395-399.