

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь - магістр

на тему **«ЯКІСНИЙ СТАН ЛІПОПРОТЕЇНІВ ТА АКТИВНІСТЬ
ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ ЗА ХРОНІЧНОЇ СЕРЦЕВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ»**

Виконала: студентка 6-го року навчання
спеціальності 091 — біологія
Вербицька Юлія Валентинівна

Керівники:

Кучменко О. Б., д. б. н., професор, провідний
науковий співробітник відділу імунології та
біохімії Національного наукового центру
«Інституту кардіології імені М. Д. Стражеска»
НАМН України
Шпильчин В.В., к. б. н.,
ст. викладач кафедри біології НаУКМА

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____

Пасічник Т.В.

«____» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
РОЗДІЛ 1.....	8
1.1 Особливості обміну ліпопротеїнів за умов розвитку серцевої недостатності.....	8
1.2 Характеристика якісного стану ліпопротеїнів за умов серцевої недостатності.....	13
1.3 Інтенсивність запальної реакції за серцевої недостатності.....	20
РОЗДІЛ 2.....	26
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	26
2.1. Об'єкт та матеріали дослідження.....	26
2.1.1. Загальна характеристика досліджуваної вибірки.....	26
2.1.2. Статистичний аналіз даних.....	27
2.2. Методи дослідження.....	27
2.2.1. Визначення активності мієлопероксидази.....	27
2.2.2. Визначення активності параоксонази-1.....	28
2.2.3. Визначення активності активатора плазміногену.....	29
2.2.4. Визначення окислених протеїнів в ліпопротеїнах високої та низької густини.....	30
2.2.5. Визначення індексу перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів.....	32
2.2.6. Визначення загального холестеролу в сироватці крові за методом Ілька.....	33
2.2.7. Визначення триацилгліцеролів в сироватці колориметричним методом.....	35
2.2.8. Визначення холестеролу, що пов'язаний з ліпопротеїнами високої густини.....	36

2.2.9. Метод визначення холестеролу, що пов'язаний з ліпопротеїнами низької густини.....	37
2.2.10. Визначення коефіцієнту атерогенності.....	37
РОЗДІЛ 3.....	39
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	39
3.1. Визначення кількісних показників обміну ліпідів та ліпопротеїнів.....	39
3.2. Визначення коефіцієнту атерогенності.....	42
3.3. Визначення якісного стану ліпопротеїнів високої густини за активністю асоційованих з ними ензимів.....	43
3.4. Аналіз стану ліпопротеїнів низької та високої густини за ступенем їх окиснення.....	45
3.5. Визначення індексу перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів.....	47
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	49
ВИСНОВКИ.....	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	52

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ХСН – хронічна серцева недостатність

ІХС – ішемічна хвороба серця

АГ – артеріальна гіпертензія

ТГ – тригліцериди

ФЛ –фосфоліпіди

ХС– холестерин

ЗХ – загальний холестерин

ХМ – хіломікрони

ЛП – ліпопротеїни

ЛПДВЩ – ліпопротеїни високої щільності

ЛППЩ – ліпопротеїни проміжної щільності

ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності

ЛПДНЩ – ліпопротеїни дуже низької щільності

РОН/ ПОН – параоксоназа

МПО – мієлопероксидаза

ММП-12 – макрофагальна матриксна металопротеїназа 12

СРБ – С-реактивний білок

АСБ – атеросклеротичні бляшки

Ліпопротеїн (а) – Lp (а)

ВСТУП

У ХХІ столітті хронічна серцева недостатність (ХСН) залишається найважливішою проблемною галуззю сучасної медицини та має величезне соціальне значення у зв'язку з високою поширеністю, неухильно наростаючим, прогностично несприятливим перебігом і значними економічними втратами.

За даними національних реєстрів європейських країн та епідеміологічних досліджень, поширеність ХСН серед дорослого населення складає 1–5 % та зростає пропорційно віку, серед осіб віком понад 65 років вона становить 10 % (Р. Ponikowski et al., 2016). Наприклад, у людей старше 65 років ХСН складає більш ніж 10 %. Незважаючи на успіхи в лікуванні, захворюваність і смертність залишаються високими: 80% чоловіків і 70% жінок віком 65 років і старше помирають протягом 8 років після первинного діагнозу. Рівень смертності, орієнтованої на 5 років після настання серцевої недостатності, становить 50% у чоловіків і 46% у жінок [20].

Про вагомість прогнозу клінічно-маніфестованої ХСН свідчить те, що приблизно половина таких пацієнтів помирає протягом 4 років, а у хворих з тяжкою ХСН смертність протягом найближчого року сягає 50 %. З віком населення серцева недостатність і надалі залишатиметься зростаючою проблемою охорони здоров'я. З огляду на сталу демографічну тенденцію, у тому числі і в Україні, зростання питомої ваги населення старших вікових груп, питання надання медичної допомоги хворим із ХСН набуває дедалі більшої актуальності [23].

Близько двох третин випадків ХСН є наслідком ішемічної хвороби серця (ІХС). За даними багаточентрових досліджень (CONSENSUS, SOLVD, ATLAS, CIBIS-II, COPERNICUS, SENIORS-SHF, MERIT-HF, NETWORK, GISSI-HF, Val-HeFT, DIG, CHECK-HF, OPERA-HF, SEE-HF), ІХС стала провідною причиною серцевої недостатності, її виявлено у 64 % хворих із ХСН (Р. Н. Lam et al., 2018; J. J. Brugts et al., 2018; I. Sokoreli et al., 2018; L. H. Lund et al., 2018; J. Chen et al., 2011).

Актуальним аспектом проблеми ХСН є серцево-судинна коморбідність, котра може виникнути як наслідок ураження органів-мішеней під час серцево-судинних захворювань (ССЗ), так і як причина прогресування та декомпенсації ХСН, що призводить до смерті (А. Е. Березин, 2017). Тому заслуговують на увагу стани, що погіршують перебіг та прогноз ХСН.

Ключовим фактором для метаболічного синдрому є порушення ліпідного обміну. Водночас одним з супутніх ускладнень є виникнення захворювань серцево-судинної системи, гіпертензії, атеросклерозу, ліпотоксичності тощо. Однак регуляція ліпідного обміну в серці та великих судинах є малодослідженою, мало відомі генетичні передумови для виникнення функціональних та структурних порушень [55]. Порушення обміну ліпопротеїнів, зокрема підвищений рівень тригліцеридів, низький холестерин ЛПВГ і збільшення кількості часточок ЛПНГ малої щільності найчастіше виявляються у пацієнтів кардіометаболічного ризику [26].

На сьогодні відсутній уніфікований перелік прогностичних маркерів серцево-судинних захворювань, тому вивчення потенційних індикаторів розвитку патологічних станів серцево-судинної системи є необхідним та важливим для їхнього попередження та уникненні вторинних ускладнень. Також повний механізм виникнення первинних і вторинних кардіометаболічних ризиків повністю невідомий [24].

Тому метою нашої роботи є дослідження якісного стану ліпопротеїнів та активність запальної реакції за хронічної серцевої недостатності.

Для досягнення визначеної мети було сформульовано такі завдання:

1. Визначити кількісні показники обміну ліпідів та ліпопротеїнів, а саме вміст загального холестеролу, холестеролу у складі ліпопротеїнів низької та високої густини, триацилгліцеролів у пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю. На основі отриманих значень розрахувати коефіцієнт атерогенності для дослідної групи;

2. Визначити якісний стан ліпопротеїнів високої густини за активністю асоційованих з ними ензимів, зокрема параоксонази-1 та мієлопероксидази;
3. Проаналізувати стан ліпопротеїнів низької та високої густини за ступенем їхнього окиснення;
4. Встановити індекс перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1

1.1. Особливості обміну ліпопротеїнів за умов розвитку хронічної серцевої недостатності

Серцево-судинні захворювання залишаються головною причиною смертності в Європі, спричиняючи 46% всіх смертей. Ці порушення викликають більшу частку смертей серед жінок (51%), ніж серед чоловіків (42%). Однак ці випадки смерті частіше трапляються в літньому віці у жінок [20].

Хронічна серцева недостатність (ХСН) є головною проблемою охорони здоров'я, і розуміння факторів, пов'язаних з її смертністю та захворюваністю, може допомогти кращому керуванню захворюванням. ХСН – синдром, обумовлений згідно з традиційними уявленнями порушенням нейрогуморальної регуляції діяльності органів кровообігу, яке супроводжується зниженням систолічної і / або діастолічної функції міокарда і проявляється застійними явищами у великому і / або малому колі кровообігу. Зміна архітекτονіки, що приводить до дилатації порожнин серця, зниження розтяжності кардіоміоцитів зі зменшенням рухливості стінок лівого шлуночка, затримка натрію і відповідно води, ремоделювання судин зі збільшенням післянавантаження, активація нейрогуморальних систем є відомим явищем патогенезу ХСН [2].

ХСН є результатом більшості серцево-судинних захворювань різної етіології. Провідними причинами розвитку ХСН є ішемічна хвороба серця (ІХС), артеріальна гіпертензія (АГ) та кардіоміопатія. За даними багатоцентрових клінічних досліджень частота ХСН, обумовленої ІХС, складає 48-73 %, АГ – 12-17 % і кардіоміопатією – 7-14 % від усіх випадків ХСН [13]. В основі патогенезу ХСН лежить нездатність серця (при не зниженому об'ємі циркулюючої крові та рівні гемоглобіну в крові) забезпечувати кров'ю тканини тіла людини відповідно до їх метаболічних потреб в стані спокою і/ або при

помірних фізичних навантаженнях, що і складає основу гемодинамічної моделі ХСН.

Оскільки серце постійно виконує зовнішню роботу, викидаючи кров в аорту, енергетичні потреби цього органу значно перевищують нормальне підтримання клітинної цілісності [28]. Перетворення серцевої енергії є високоспеціалізованим для підтримки фізіологічних концентрацій фосфатних зв'язків, багатих енергією, в умовах великих варіацій зовнішньої роботи. Підтримка клітинних метаболітів під час зміни навантаження називається метаболічним гомеостазом. Серце має відносно низький вміст АТФ (5 мкмоль/г) та високу швидкість гідролізу АТФ (приблизно 30 мкмоль/г). Отже, відбувається повна оборотність пулу АТФ міокарда приблизно кожні 10 с у нормальних умовах. Добовий оборот АТФ у серці людини у багато разів перевищує вагу серця. Метаболічний гомеостаз вимагає точного налаштування серцевого обміну різних субстратів.

Незважаючи на контроль використання жирної кислоти та глюкози, серце найкраще функціонує, коли одночасно окислює обидва субстрати. Іншими конкуруючими енергетичними субстратами є лактат, кетони та амінокислоти. Принциповий огляд β -окислення жирної кислоти в кардіоміоцитах та їх взаємний зв'язок з метаболізмом глюкози показаний на рисунку 1.1. Жирні кислоти потрапляють у кардіоміоцити або пасивною дифузією, або через опосередковані білками шляхи, включаючи CD36 (транслокази жирної кислоти) та FATP1. Глюкоза може потрапляти в кардіоміоцити через транспортери GLUT4 або GLUT1. Декарбоксилювання піруватом є ключовим незворотним етапом окислення вуглеводів і каталізується піруватдегідрогеназою, яка знаходиться в мітохондріальній матриці. Підвищене генерування ацетил-КоА, одержуваного при β -окисленні жирної кислоти, знижує активність піруватдегідрогенази за рахунок активації піруватдегідрогенази-кінази та подальшого фосфорилування та інгібування піруватдегідрогенази.

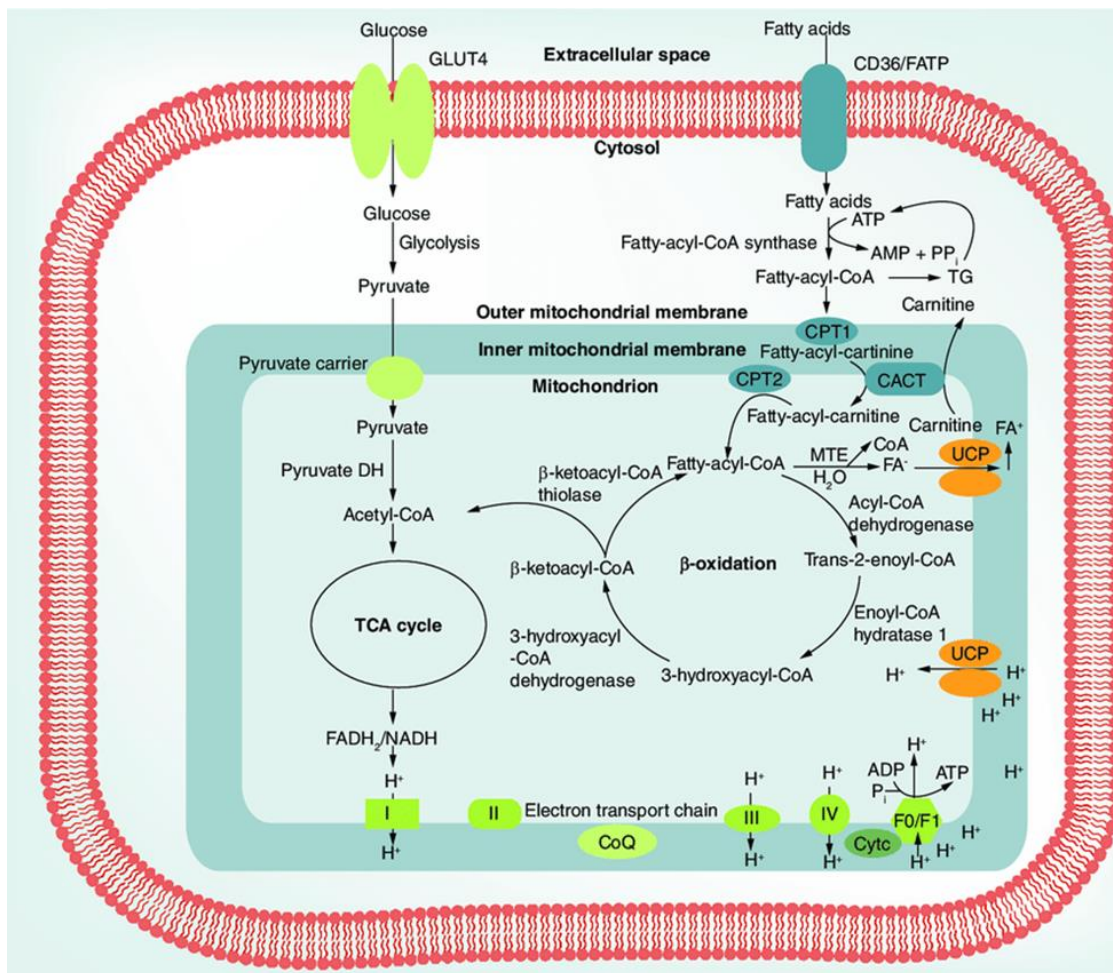


Рис 1.1. Схематичний огляд β -окислення жирної кислоти у кардіоміоцитах та її взаємозв'язок з метаболізмом глюкози.

Жирні кислоти надходять до серця як вільні кислоти, пов'язані з альбуміном, або як жирні кислоти, що виділяються з тригліцеридів, що містяться в хіломікронах, або ліпопротеїнах дуже низької щільності. Більшість ліпідів, що надходять до серцевих клітин, спрямовуються на утилізацію жирних кислот, частина зберігається або використовується для структурних потреб. Вміст тригліцеридів у здорових суб'єктів (приблизно 3 мг на г тканини) дуже низький порівняно зі швидкістю поглинання вільної жирної кислоти (приблизно 3 мг на г тканини на годину). Нормальні концентрації вільної жирної кислоти, що циркулюють, коливаються в межах від 0,2 до 0,6 мМ.

Хронічно підвищені концентрації вільних жирних кислот, що циркулюють, спостерігаються у людей з ожирінням, інсулінорезистентних суб'єктів з дисрегульованим ліполізмом та у пацієнтів з явним діабетом.

Концентрація жирної кислоти в артеріях є основним визначальним фактором швидкості поглинання та окислення міокардом жирних кислот. Більшість жирних кислот, які використовуються серцем, походять від екзогенних тригліцеридів, які в свою чергу походять від хіломікронів, і лише незначна частина походить від ЛПДНЩ. Тригліцериди в межах хіломікронів та ЛПДНЩ потребують гідролізу ліпопротеїновою ліпазою на поверхні люмінальних клітин ендотелію. Ліпопротеїнова ліпаза асоціюється з протеогліканами. Вільні жирні кислоти, що походять або з альбуміну, або утворюються під дією ліпопротеїнової ліпази в ендотелії капілярів, надходять у кардіоміоцити або пасивною дифузією, або шляхом опосередкованих носіїв білків. Поглинання ліпопротеїнів, багатих тригліцедами в серце, може відбуватися через рецептор ЛПДНЩ. Міокардіальні жирні кислоти також можуть бути отримані з ліпогенезу *de novo*.

Цикл Рандла описує зворотну залежність між метаболізмом жирної кислоти та глюкози. Декарбоксилювання піруватом є ключовим незворотним етапом окислення вуглеводів і каталізується піруватдегідрогеназою, яка знаходиться в мітохондріальній матриці. [8]

Метаболізм ліпопротеїнів – це складний процес, що включає як різноманітні переміщення ліпідів і апопротеїнів між окремими класами ліпопротеїнів, так і цілий ряд реакцій, що каталізуються ферментами. Основними ліпідами плазми крові людини є тригліцериди (ТГ), фосфоліпіди (ФЛ) і холестерин (ХС). Ліпіди циркулюють в крові в комплексі зі специфічними білками (апобілки), тобто у вигляді ліпопротеїнів (ЛП) [1].

Ліпопротеїни – це складні молекули з центральним гідрофобним ядром. Це гідрофобне ядро оточене гідрофільною мембраною, що складається з фосфоліпідів, вільного холестерину та аполіпопротеїнів [39]. Плазмові ліпопротеїни можна розділити на сім класів за розміром, ліпідним складом та аполіпопротеїнами.

Хіломікрони – це великі тригліцериди, які беруть участь у транспортуванні дієтичних тригліцеридів та холестерину до периферичних

тканин та печінки. Ці частинки містять аполіпопротеїни AI, A-II, A-IV, AV, B-48, C-II, C-III та E. Аро В-48 є основним структурним білком, і кожна частинка хіломікрона містить один Аро В-48 молекули. Розмір хіломікронів змінюється в залежності від кількості споживаного жиру. Їжа з високим вмістом жиру призводить до утворення великих частинок хіломікрону через збільшення кількості тригліцеридів, що перевозяться, тоді як в стані голодування частинки хіломікрону є невеликими, зменшуючи кількість тригліцеридів.

Залишки хіломікрону. Видалення тригліцеридів з хіломікронів периферичними тканинами призводить до отримання більш дрібних частинок, званих залишками хіломікрону. Порівняно з хіломікронами ці частинки збагачені холестерином і є проатерогенними.

Ліпопротеїди дуже низької щільності (ЛПДНЩ). Ці частинки виробляються печінкою і багаті тригліцеридами. Вони містять аполіпопротеїни В-100, С-I, С-II, С-III та E. Аро В-100 є основним структурним білком, і кожна частинка ЛПДНЩ містить одну молекулу Аро В-100. Подібно до хіломікронів розмір частинок ЛПДНЩ може змінюватись залежно від кількості тригліцеридів, що переносяться в частинці.

Ліпопротеїди проміжної щільності (ЛППЩ). Видалення тригліцеридів з ЛПНЩ м'язовою та жировою тканиною призводить до утворення частинок ЛППЩ, збагачених холестерином. Ці частинки містять аполіпопротеїни В-100 та E. Ці частинки є проатерогенними.

Ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ). Ці частинки походять від частинок ЛПДНЩ та ЛППЩ і вони ще більше збагачуються холестерином. ЛПНЩ переносять більшу кількість холестерину, який знаходиться в кровообігу. Переважаючим аполіпопротеїном є В-100, і кожна частинка містить одну молекулу Аро В-100. ЛПНЩ складається з спектра часток, що змінюються за розміром і щільністю. Досить багато дрібних щільних часток ЛПНЩ спостерігається в поєднанні з гіпертригліцеринемією, низьким рівнем ЛПВЩ, ожирінням, діабетом 2 типу (тобто пацієнтами з метаболічним синдромом) та інфекційно-запальними станами. Ці невеликі щільні частинки ЛПНЩ з ряду

причин вважаються більш проатерогенними, ніж великі частинки ЛПНЩ. Нарешті, невеликі щільні частинки ЛПНЩ більш чутливі до окислення, що може призвести до посиленого поглинання макрофагами [38].

Ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ). Ці частинки відіграють важливу роль у зворотному транспорті холестерину від периферичних тканин до печінки, що є одним із потенційних механізмів, за допомогою яких ЛПВЩ може бути антиатерогенним. Крім того, частинки ЛПВЩ мають антиоксидантні, протизапальні, антитромботичні та антиапоптотичні властивості, що також може сприяти їх здатності гальмувати атеросклероз. Частинки збагачені холестерином та фосфоліпідами. З цими частинками пов'язані аполіпопротеїни А-I, А-II, А-IV, С-I, С-II, С-III та Е. Аро А-I є основним структурним білком, і кожна частинка ЛПВЩ може містити кілька молекул Аро А-I. Частинки ЛПВЩ є дуже неоднорідними і їх можна класифікувати за щільністю, розміром, зарядом або складом аполіпопротеїну.

Ліпопротеїн (а) (Lp (a)). Lp (a) - частинка ЛПВЩ, яка має аполіпопротеїн (а), приєднаний до Аро В-100 через дисульфідний зв'язок. Ця частинка є проатерогенною. Фізіологічна функція цього ліпопротеїну невідома.

Аполіпопротеїни виконують чотири основні функції, в тому числі:

- 1) виконують структурну роль,
- 2) виконують роль лігандів для ліпопротеїнових рецепторів,
- 3) керують утворенням ліпопротеїнів,
- 4) служать активаторами або інгібіторами ферментів, що беруть участь у метаболізмі ліпопротеїнів. Таким чином, аполіпопротеїни відіграють вирішальну роль у метаболізмі ліпопротеїнів [34, 35, 37,57].

1.2. Характеристика якісного стану ліпопротеїнів за умов серцевої недостатності

Зміна ліпідного профілю в сироватці крові, підвищення загального холестерину, тригліцеридів та холестерину ліпопротеїнів низької щільності та зниження рівня холестерину ліпопротеїнів високої щільності є ключовими факторами прогресування серцево-судинних захворювань [36].

ХСН сильно пов'язана з наявністю ішемічної хвороби серця і показано, що холестерин є головним несприятливим фактором ризику розвитку ішемічної хвороби серця [42]. Відомо, що пацієнти з розвинутою ХСН мають важкі симптоми, високий рівень смертності та низький рівень холестерину. Це може бути пов'язано із запаленням, ендотоксинами, адренергічною активацією, окислювальним стресом, травмами тканин та кахексією. Подібна сукупність факторів ймовірно, буде спричинена низьким рівнем холестерину та катаболічним станом. В епідеміологічних дослідженнях та аналізах клінічних випробувань більш високий рівень холестерину був пов'язаний з кращою виживаністю [10].

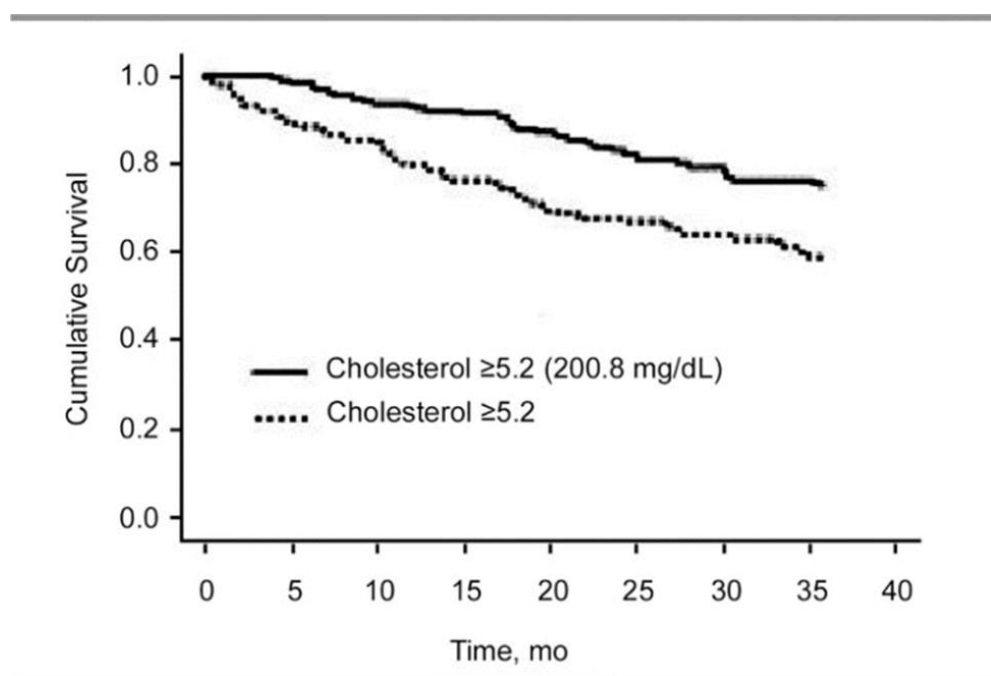


Рис.1.2.1. Співвідношення між рівнем холестерину та смертністю у групі 114 пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю після 3-х років спостереження.

Зв'язок між холестерином та виживаністю ХСН не встановлений повністю. Висунута гіпотеза, що низький рівень холестерину в сироватці крові може бути маркером порушеного прогнозу у пацієнтів із ХСН. Холестерин є провісником підвищення захворюваності та смертності від ішемічної хвороби, а захворювання коронарної артерії – найпоширеніша причина виникнення ХСН в індустріальних суспільствах. Виникнення серцевої недостатності зменшується

при тривалому лікуванні препаратами, що знижують холестерин. Можливо, більш високий рівень холестерину є більшим метаболічним резервом для боротьби з синдромом ХСН. Однак дослідники вважають, що ліпопротеїни в ХСН можуть мати певну захисну роль [45]. Якщо холестерин обмежує вироблення цитокінів, особливо під час фаз клінічного погіршення, то високий рівень холестерину може мати сильний позитивний вплив на виживання.

У пацієнтів із ХСН спостерігається дифузне підвищення показників імунної активності, яке потенційно пов'язане з рівнем ендотоксину, що перевищує норму [50]. Ліпопротеїни – природні неспецифічні буфери ендотоксину; зв'язування з ендотоксином (ліпополісахарид [LPS]) призводить до зниження біоактивності LPS та до зниження імунної активації. Попередні дослідження дозволяють припустити, що у пацієнтів із ХСН із низьким рівнем холестерину спостерігається підвищена смертність [10,11].

Тригліцериди – це нейтральні ліпіди, що складаються з гліцеринової основи та трьох довголанцюгових жирних кислот. ТГ в основному містяться в хіломікронах, які транспортують харчові жирні кислоти та холестерин з кишечника, і частинках ЛПДНЩ, які транспортують ТГ з печінки. Ці молекули є основним джерелом накопиченої енергії в таких різноманітних тканинах, як жирова тканина та скелетний м'яз, і вони є невід'ємними компонентами частинок ліпопротеїну, синтезованих печінкою та тонким кишечником. Тригліцериди з'являються в міжнародних керівних принципах при розгляді терапії ХСН.

Коли рівень ТГ підвищений через ізольоване підвищення рівня хіломікронів, які занадто великі, щоб потрапити в стінку артерії, атеросклеротичний ризик не збільшується.

При запусненій серцевій недостатності механізми, подібні до тих, що викликають низький рівень холестерину, можуть викликати низький рівень тригліцеридів. Здається, серцева недостатність може змінити як виробництво, так і зберігання тригліцеридів. Втрата основного джерела енергії може негативно вплинути на виживання хворих на ХСН.

Низький рівень тригліцеридів може бути ознакою більш запущеної стадії голодування у ХСН. Зниження рівня тригліцеридів може бути наслідком асоційованих факторів під час ХСН: розвинуті стани скупчення в шлунково-кишковій системі та печінці, зменшення споживання їжі, збільшення кахексії та підвищення рівня запалення. Хоча зниження рівня тригліцеридів у сироватці крові є провісником серцево-судинної смерті у пацієнтів із серцевою недостатністю, причини низьких рівнів тригліцеридів невідомі і потребують подальшого дослідження [7,19,33].

Холестерин ліпопротеїнів низької густини, основний компонент загального холестерину, визнається найважливішим фактором ризику ліпідів.

Плазмові концентрації ЛПНГ та ЛПВГ мають протилежний характерний вплив на ініціювання, прогресування та дестабілізацію атеросклеротичних бляшок, таким чином, що дисбаланс на користь ЛПНГ сприяє розвитку атеросклерозу, тоді як ЛПВГ виступає захисним фактором.

Зниження рівня холестерину ЛПНГ знижує захворюваність на атеросклеротичну хворобу, незалежно від того, як саме досягається зниження. Рандомізовані дані випробувань також дозволяють припустити, що прогресування атеросклерозу та ІХС знижуються до мінімуму, коли рівень холестерину ЛПНГ знижується до менш ніж 70 мг/дл (1,8 ммоль/л). Зниження рівня холестерину ЛПНГ, що наближається до 50%, необхідне для припинення прогресування атеросклеротичної бляшки.

Високий рівень ЛПНГ пов'язаний із підвищеним ризиком серцевих захворювань та інсульту. ЛПНГ транспортує холестерин до артерій, і коли рівень ЛПНГ підвищений, цей холестерин може накопичуватися в стінках судин і сприяти утворенню нальоту. Це утворення нальоту, або атеросклероз, з часом може призвести до звуження судини і зменшення припливу крові до серця (ішемічна хвороба).

ЛПВГ переносить холестерин до печінки, де він виводиться з кровообігу та виводиться з організму. Таким чином ЛПВГ може запобігти утворенню нальоту, захистити артерії та зменшити ризик серцево-судинних захворювань.

Зазвичай вважається, що чим вище рівень цього хорошого холестерину, тим нижчий ризик виникнення захворювань серця, судинних захворювань та інсульту.

Більш високий рівень холестерину ЛПВГ залишається незалежно пов'язаним із меншими шансами смертності за всіма причинами у пацієнтів із ХСН. Механізми, пов'язані з перевагами виживання від підвищення рівня холестерину ЛПВГ, є багатфакторними. З одного боку, пацієнти з більш високим рівнем холестерину ЛПВГ можуть мати кращий харчовий статус, що відображається на більш високих рівнях ТС, ЛПНГ, АроА1, АроВ100. Більш високий рівень холестерину ЛПВЩ є сприятливим для покращення системного запалення. Крім того, холестерин ЛПВЩ має інші серцево-захисні властивості, такі як холестерин-зворотний транспорт, і теоретично ця ефективність також може бути пов'язана з користю для виживання [14,15].

Якісний стан ліпопротеїнів визначається за функціональною активністю ензимів. Параоксоназа 1 сироватки людини (PON1) - фермент, пов'язаний з ХС-ЛПВЩ, який вважається головним визначальним фактором антиоксидантної дії ХС-ЛПВЩ. PON1 має детоксикаційну активність при атеросклеротичних процесах. Кілька досліджень повідомили, що PON1 і ЛПВЩ захищають від окислювальної модифікації ЛПНЩ. Інші дослідження показали, що PON1 може запобігати накопиченню пероксиду ліпідів на ЛПНЩ *in vitro* та *in vivo*. Також показано, що активність PON1 у сироватці крові знижується при сімейній гіперхолестеринемії та захворюваннях, пов'язаних із прискореним атерогенезом. Антиатерогенні дії параоксонази 1 захищають частинки ліпопротеїдів від окислення вільних радикалів. Моніторинг тенденцій серцево-судинних ускладнень за допомогою PON1 активності має вирішальне значення для лікування пацієнтів із ІХС.

Активність параоксонази 1 позитивно корелює із рівнями ХС-ЛПВГ та обернено корелює з атерогенним індексом, що дозволяє припустити, що зниження активності PON1 може бути викликане частково за рахунок споживання PON1 для профілактики окислення. Це напевно говорить про те,

що зниження активності PON1 може бути принаймні частково пов'язане із споживанням PON1, викликаним процесом окисного стресу. Останнім часом були вивчені ролі PON1 у ряді процесів, включаючи обмін ліпідів та ліпопротеїнів, а також їх антиатерогенні та антиоксидантні властивості. Також відомо, що зниження активності PON1 пов'язане зі зниженою концентрацією ЛПВЩ, виявленою при ІХС.

PON1 розглядають як кардіопротекторний фермент. Визначення рівня активності ферменту може бути використано як діагностичний тест для оцінки ризику розвитку серцево-судинної патології, за розвитку якої вміст ферменту та рівень його активності в плазмі крові значно знижуються, що призводить до підсилення атерогенезу

Маючи антиатерогенні властивості, він сприяє регресії атеросклеротичних бляшок. Як кардіопротекторний ензим він сприяє нормалізації роботи кардіоміоцитів, тому встановлення його вмісту та активності важливе для ранньої діагностики серцево-судинних захворювань [4,5,9,52].

Мієлопероксидаза (МПО) – біомаркер запалення та окислювального стресу, який виробляються нейтрофілами, моноцитами та ендотеліальними клітинами. МПО каталізує утворення реакційноздатних видів кисню, дифундуючих видів радикалів та окислювачів, одержуваних оксидом азоту (NO). МПО виробляє окислювачі під час запалення, які часто сприяють травмуванню тканин через окислення білка та ліпідів.

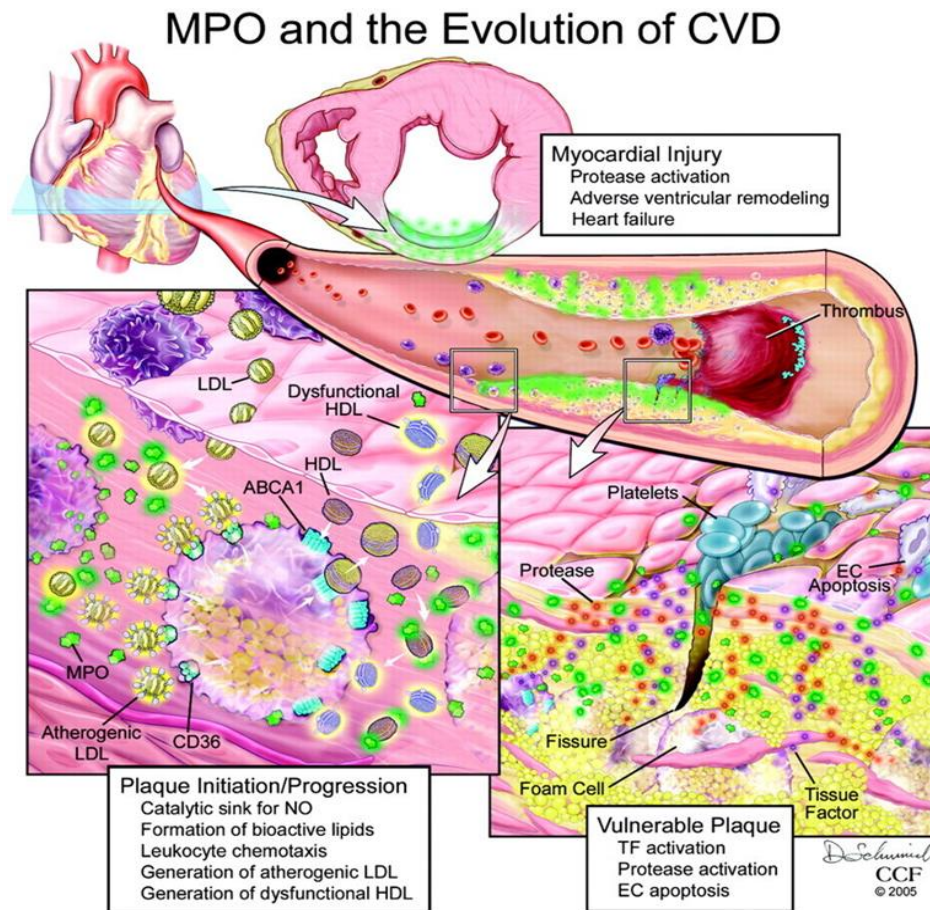


Рис. 1.2.2. Схема, що ілюструє численні процеси протягом еволюції атеросклерозу, в яких бере участь МПО.

МПО може забезпечити механічний зв'язок між запаленням та порушенням серцевої реконструкції. Тому припускається, що МПО може бути пов'язаний з прогресуванням хвороби та тяжкістю при хронічній серцевій недостатності. Численні докази свідчать про механістичний зв'язок між МПО, запаленням, гострими та хронічними проявами серцево-судинних захворювань. Також визначено МПО як важливий прогностичний біомаркер для вразливості бляшок та гострих коронарних синдромів.

МПО може сприяти ендотеліальній дисфункції, трансміграції лейкоцитів, може брати участь в ішемічних ускладненнях атеросклерозу через активацію протеазних каскадів та просування апоптозу ендотеліальної клітини.

МПО модулює каскади протеаз і генерує цитотоксичні види, пов'язані з аномальним ремоделюванням шлуночків після інфарктів міокарда. Крім того, підвищений рівень МПО асоціюється з ендотеліальною дисфункцією, ще одним

патофізіологічним процесом. Концентрації МПО прогнозують летальність у пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю [21,29].

1.3. Інтенсивність запальної реакції за серцевої недостатності

Зважаючи на складність і недостатню вивченість механізмів розвитку ХСН в кінці XX століття, була запропонована нова концепція, яка ґрунтується на уявленнях про імунну активацію і системне запалення, які є предикторами високого ризику виникнення серцево-судинних порушень і несприятливого прогнозу. У відповідності з цією концепцією, яка доповнює наші традиційні уявлення, істотний вплив на прогресування СН і декомпенсацію діяльності серця здійснюють прозапальні цитокіни [54].

Цитокіни являють собою білкові інформаційні молекули, що відповідають за регуляцію міжклітинних і міжсистемних взаємодій, що визначають виживаність клітин, стимуляцію або пригнічення їх росту, диференціювання, функціональну активність і апоптоз, а також забезпечення узгодженості дій ендокринної, нервової та імунної систем в нормі і при патології. Фармакодинамічні і патофізіологічні ефекти цитокінів наступні: мобілізація з кісткового мозку нейтрофілів, вазодилатація і зменшення опору судин, ослаблення діяльності серця, активація ліпопротеїнліпази і лактатдегідрогенази, що призводить до порушення енергетичного обміну в тканинах. В даний час відомо більше 30 видів цитокінів, які на їхню структуру і біологічній дії відносяться до наступних груп.

1. Прозапальні цитокіни, що забезпечують реалізацію запальної відповіді: інтерлейкіни (ІЛ) 1, 2, 6, 8, α -фактор некрозу пухлини (α -ФНП), інтерферон- γ .

2. Протизапальні цитокіни, що обмежують запалення: ІЛ-4, ІЛ-10, що трансформує β -фактор росту.

3. Регулятори клітинного і гуморального імунітету (природного або специфічного), що володіють власними ефекторними властивостями (протівірусними, цитотоксичними).

У популяційних дослідженнях підтверджено несприятливе прогностичне значення підвищення в крові рівня ряду цитокінів (α -ФНП, ІЛ-6) і С-реактивного білка (СРБ), відзначена позитивна кореляція між рівнями α -ФНП, СРБ, ІЛ-6 і функціональним класом (ФК) ХСН. Слід зазначити, що підвищення продукції ІЛ-6 і α -ФНП у пацієнтів з кардіогенний шоком виявилось порівнянним з інтенсивністю системного запалення при сепсисі та інфекційно-токсичному шоці, а купірування його проявів супроводжується значним зниженням рівнів прозапальних цитокінів в крові.

Опосередковане цитокінами системне субклінічне запалення, як виявилось, пов'язане з активацією симпатикоадреналової і реніангіотензинової систем, дисфункцією ендотелію, про- і антиоксидантним дисбалансом та іншими патогенетичними ланками ХСН. З огляду на це стає більш зрозумілою роль імунзапального процесу в індукції і прогресуванні ремоделюванні міокарда і відповідно в наростанні ступеня тяжкості ХСН.

У літературі серед процесів, що провокують гіперекспресію ендотеліоцитів і КМЦ ряду цитокінів, описані механічне перевантаження КМЦ дилатованого ЛШ; ішемія, гіпоксія міокарда. При цьому відбувається не тільки підвищення рівнів ангіотензину II, катехоламінів і кортизолу, а й відзначається виділення ендотоксинів з застійного вмісту кишечника, вільнорадикальне пошкодження м'язової тканини. Посилення продукції α -ФНП і ІЛ-1 стимулює вироблення ІЛ-6, що приводить в дію цілий каскад цитокінів з потужними імунзапальними властивостями, що характеризуються перехресною, синергічною активністю.

До важливих маркерів системного запалення при ХСН відноситься СРБ, який традиційно розглядався в якості білка острофазної відповіді. Його синтез і секрецію забезпечує печінка, а за регуляцію цих процесів відповідають цитокіни, насамперед ІЛ-6 і в меншій мірі ІЛ-1 і α -ФНП. У міру прогресування ХСН у хворих визначається підвищення рівня α -ФНП, ІЛ-6, СРБ.

При ХСН активація каскаду цитокінів, дисбаланс про- та протизапальних цитокінів в бік переважання перших відбувається в міокарді, скелетних м'язах,

імунокомпетентних клітинах. Гіперекспресія цитокінів викликає ряд несприятливих ефектів: зменшення гомеостазу внутрішньоклітинного кальцію з підвищенням концентрації цитозольного кальцію; порушення сполучення адренорецепторів з аденілатциклази з блокуванням адренергічних сигналів; активація металопротеїназ, порушення експресії iNOS - ферменту, що каталізує синтез оксиду азоту з L-аргініну в КМЦ і ендотеліальних клітинах з наступною продукцією NO і утворенням при його взаємодії з супероксид-аніоном високотоксичного пероксінітрита. СРБ в свою чергу не тільки є маркером запалення, але і надає прямий вплив на ендотелій судин міокарда, ефекти оксиду азоту і підвищуючи продукцію ендотеліну-1. Крім того, відбувається активація системи комплементу, кінцевий продукт якого - комплекс, атакуючий мембрану КМЦ і який володіє прокоагулянтною активністю. При цьому підвищується концентрація внутрішньоклітинного кальцію з порушенням функції і / або загибеллю КМЦ.

Патологічні ефекти α -ФНП, СРБ, ІЛ-6 при ХСН можуть бути наступні:

- 1) негативна інотропна дію на міокард;
- 2) зміна архітектоніки серця з незворотньою ділатацією камер і гіпертрофією КМЦ;
- 3) порушення залежної від ендотелію ділатації артеріол;
- 4) індукція процесів катаболізму в скелетних м'язах і прогресування м'язової дистрофії. За іншими даними, хронічна гіпоксія ініціює системну запальну реакцію як наслідок імунної су преси та вторинного інфікування.

На пізніх стадіях СН системна гіпоксія, що є наслідком важкого порушення центральної гемодинаміки і мікроциркуляції, спричиняє підвищення концентрації прозапальних цитокінів і молекул адгезії в крові. При гіперекспресії α -ФНП розвивається патологія міокарда, подібна до ділатаційної кардіоміопатії, яка характеризується наступним:

- 1) інтерстиціальною інфільтрацією, фіброзом, апоптозом КМЦ;
- 2) розширенням порожнин серця;
- 3) зменшенням фракції викиду ЛШ;

- 4) зниженням відповіді на $\beta 1$ -адренергічні стимули;
- 5) гіперпродукцією натрійуретичного фактора в тканини шлуночків;
- 6) зниженням виживання біологічних об'єктів.

Зв'язок вираженості СН і ступеня підвищення продукції цитокінів залишається неясним. За одними даними, підвищення рівня α -ФНП виявляється у хворих з тяжкою застійною СН і відсутній у пацієнтів з дисфункцією ЛШ легкого або середнього ступеня тяжкості. Інші дослідження повідомляють про підвищення рівня α -ФНП в плазмі крові у хворих не тільки з важкою СН, але і з безсимптомними формами дисфункції ЛШ.

Продукція ІЛ-6 та ІЛ-8 значно збільшується як при гострій СН, так і при ХСН, а також у пацієнтів з дисфункцією ЛШ легкого або середнього ступеня тяжкості. При цьому якщо α -ФНП не визначається в плазмі крові, це не виключає наявності біологічно активного рівня цього фактора в плазмі *in vivo*. Концентрація α -ФНП може бути нижче рівня чутливості методу, а його розчинні рецептори, які змінюються при СН, можуть ускладнювати або навіть пригнічувати визначення α -ФНП в плазмі за допомогою імуноферментного аналізу. Разом з тим, за даними деяких досліджень, зміст α -ФНП у хворих з СН І-ІІ ФК значно перевищує такий показник у осіб без ознак СН і корелює з рівнем передсердної фракції натрійуретичного пептиду та інсуліноподібного фактор росту.

Припускають, що прозапальні цитокіни відіграють важливу роль в прогресуванні СН, впливаючи на інтенсивність патологічного ремоделювання міокарда та судин за рахунок регуляції інтенсивності апоптозу. Показано, що α -ФНП підвищує утворення вільних радикалів і служить причиною інтенсифікації та поглиблення процесів апоптозу ендотелію судин і інактивації оксиду азоту в ендотелії.

Незважаючи на загальну прозапальну активність розглянутих цитокінів, існують певні відмінності в механізмах їх активації і ефекти. Так, для ІЛ-1 описані два механізми експресії при ХСН:

1) продукція підвищується у відповідь на неспецифічну стимуляцію при гіпоксії і розладах мікроциркуляції;

2) індукується під впливом α -ФНП. ІЛ-1 знаходиться переважно в позаклітинному просторі, в тому числі в сироватці крові, в той час як α -ФНП здебільшого представлений в мембраноасоційованій формі, що є головною причиною більш значного підвищення рівня ІЛ-1 в порівнянні з α -ФНП [53].

Показником гостроти патологічного процесу при ХСН є рівень ІЛ-6, зміст якого збільшується при гострій декомпенсації і швидко знижується при її купіруванні. Внаслідок цього рівень даного прозапального цитокіну досягає діагностичної значущості в основному у пацієнтів з важкими клінічними проявами СН.

При цьому вже на ранніх етапах формування дисфункції ЛШ у хворих виявляється дисбаланс змісту медіаторів запалення в крові в основному за рахунок зниження рівня протизапальних цитокінів.

Основні причини підвищення концентрації цитокінів в плазмі крові при СН можуть бути описані в такий спосіб. Велика увагу дослідників привертає роль активації моноцитів при розвитку ХСН. Передбачається, що не тільки підвищений рівень моноцитів периферичної крові, але і зміна їх імуногенних властивостей можуть викликати підвищення концентрації циркулюючих цитокінів.

В одному з досліджень вивчена чутливість моноцитів периферійної крові до стимуляції ліпополісахаридом у хворих із застійною СН і без такої. Концентрація α -ФНП в плазмі крові хворих з недостатністю кровообігу після стимуляції ліпополісахаридом виявилася достовірно вище, ніж у пацієнтів без СН, а вміст ІЛ-1 достовірно не відрізнявся.

Базальний рівень цих запальних цитокінів у пацієнтів з клінічними ознаками недостатності кровообігу був також вище. Можна зробити висновок, що підвищений рівень цитокінів у хворих з СН обумовлений неспецифічною стимуляцією моноцитів. Згідно з однією з гіпотез, підвищення концентрації циркулюючих цитокінів викликано проникненням бактеріальних ендотоксинів

в організм через стінку кишечника при застійній ХСН. Згідно з іншою гіпотезою, хронічне підвищення тону симпатичної частини вегетативної нервової системи при СН обумовлює активацію імунної системи. Однак жодна з гіпотез в повній мірі не може пояснити механізми підвищення рівня цитокінів при СН у сироватці крові.

Надалі в патогенез ХСН включається один або декілька з перерахованих механізмів. Ймовірним джерелом збільшення концентрації цитокінів в плазмі крові у хворих з ХСН ішемічної природи може служити запалення в самих атеросклеротичних бляшках (АСБ), що може вказувати на їх нестабільність. На підтвердження цієї гіпотези можна навести дослідження, в якому *in vivo* зазначалося підвищення температури на поверхні нестабільної АСБ в порівнянні зі стабільною. Це підвищення строго корелювало з рівнем маркерів системного запалення.

Більш ранні дослідження показують, що підвищення температури АСБ пов'язано з підвищенням активності макрофагів. Але сила взаємодії хронічного запалення і тяжкості ІХС до сих пір не встановлена. Імовірно цитокіни сприяють формуванню синдрому СН так само, як дисфункція ЛШ призводить до підвищення їх рівня в плазмі крові. Не виключено, що взаємна активація є двома сторонами одного і того ж процесу [3,58,59].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження та загальна характеристика досліджуваної вибірки

Об'єктом дослідження є сироватка венозної крові 12-ти обстежених людей з ХСН II-IV функціонального класу за NYHA з ФВ-ЛШ $\leq 40\%$ на фоні ішемічної хвороби серця (ІХС). Діагноз встановлювали на підставі результатів клініко-інструментального обстеження з проведенням загальних клінічних досліджень, ЕКГ, рентгенологічного дослідження органів грудної клітини.

Серцеву недостатність виявляли на підставі ознак, що відображають ступінь гемодинамічних розладів: наявність і вираженість задишки, набрякового синдрому та застійних явищ в легенях.

Критерії включення:

- а) Вік від 58-72 років;
- б) люди з клінічними ознаками ХСН на рівні II-IV за класифікацією NYHA;
- в) генез ХСН-ІХС;
- г) ФВ ЛШ $\leq 40\%$ за даними ехокардіографії (ЕхоКГ);
- д) люди української вибірки.

Критерії невключення:

- а) статус курця на момент обстеження;
- б) вік понад 75 років;
- в) виражена ниркова та печінкова недостатність;
- г) бронхіальна астма;
- д) онкологічні захворювання.

Обстежені люди ($n = 12$) перебували на стаціонарному лікуванні у відділі серцевої недостатності ННЦ “Інституту кардіології ім. М.Д. Стражеска”.

Серед обстежених груп всі 12 людей – чоловіки, та медіана віку складала – 65 роки. Дослідження проводилось при поступленні в стаціонар на стадії декомпенсації.

2.1.1. Статистичний аналіз даних

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою ліцензійного пакету програм Microsoft Excel. На кожному терміні спостереження розраховували середні значення зі стандартним відхиленням. Тестом Колмогорова-Смірнова визначали характер розподілу ($P < 0,1$). Оскільки розподіл був нормальним, для опису даних за групами використовували середня значення та його стандартне відхилення. Оцінка статистичної значущості та перевірки наявності різниці між групами (контрольною та дослідною) за проводилась за критерієм Стьюдента ($P < 0,01$) [45].

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Визначення активності мієлопероксидази. Матеріал, на якому проводять визначення активності мієлопероксидази, – це плазма. Суть методу полягає у визначенні пероксидазної кінетичної реакції без та з інгібітором мієлопероксидази. Різниця оптичної густини цих двох показників відображає активність ензиму.

Першочергово отримували якісний матеріал для роботи, плазму, в якій не відбуватиметься агрегації тромбоцитів. Для цього створювали буферну систему, яка складалась з 50 мМ фосфатнатрієвого буферу ($pH=6$). Також до системи входили 380 мкМ о-діанізідинаду і п'ять відсотків від об'єму – плазма крові, в якій був присутній детергент – 1% Тритон х 100.

Наступним кроком було створення умов для проходження пероксидазної реакції за допомогою 500 мкМ перекису водню. Необхідно було прогріти зразки протягом двадцяти хвилин для збільшення швидкості реакції. Для визначення мієлопероксидази на фоні інших пероксидаз контроль залишали без змін, а в дослідний зразок додавали специфічний інгібітор – 50 мкМ амінобензойного гідрозида.

Заключний етапом стала спектрофотометрія зразків при довжині хвилі 460 нм та обрахунок за формулою (2.4) активності мієлопероксидази (МПО).

$$\Delta A_{\text{МПО}} = \left(\Delta A_{\text{мін}} - \frac{\Delta A_{\text{інг}}}{\Delta A_{\text{мін}}} \right) \times \left(\frac{V_{\text{зар}}}{V_{\text{зр}}} \right) \quad (2.1), \text{ де}$$

$\Delta A_{\text{МПО}}$ – активність МПО;

$\Delta A_{\text{мін}}$ – мінімальна активність ензиму;

$\Delta A_{\text{інг}}$ – активність ензиму при наявності інгібітора;

$V_{\text{заг}}$ – загальний об'єм;

$V_{\text{зр}}$ – об'єм окремого зразка [47].

2.2.2. Визначення активності параоксонази-1

Проведення визначення активності параоксонази-1 допомагає оцінити роботу антиоксидантної системи захисту та функціональний пов'язаного з ліпопротеїнами високої густини ензиму. Принцип методу – активність параоксонази-1 визначають за кількістю субстрату (фенілацетату), який використався під час біохімічної взаємодії, яку вимірюємо при довжині хвилі 420 нм.

Аналізували сироватку, що попередньо була розведена буфером (1:3). Формували «сліпу» пробу та два зразки (табл. 2.1). Другий відрізнявся від першого тим, що він був втричі більше розведеним (табл.2.1). Згідно методики використовувати наступні реактиви: 20 мМ трис – HCL буфер (pH 8,0), який містив 1 мМ CaCl_2 , 4 мМ фенілацетат, субстрат, робочий реагент (50 мл буфера та 25 мкл субстрату). Робочий реагент витримували 30 хвилин, при кімнатній температурі (20 °C).

Перед початком дослідження проводили обнулення спектрофотометра бідистильованою водою при $\lambda = 270$ нм. Проводили спектрофотометрію при $\lambda = 270$, кінетика спостерігалася протягом першої хвилини, однак перші 20 секунд не враховували.

Таблиця 2.1

Компонентний вміст зразків

Склад зразку/ зразок	«Сліпий» зразок	Зразок №1	Зразок №2
Робочий реагент	1000 мкл	1000 мкл	3 мл
Зразок	6.67 мкл бідистил. води	6,67 мкл сироватки	20,01 мкл сироватки

Отримані значення під час спектрофотометрії вносили в таблицю та аналізувалися. За математичною формулою (2.2) вираховували активність параоксонази-1 (A):

$$A = (\Delta A_{270}/\text{min}/0.0031) \times d \times (TV/SV) \quad (2.2), \text{ де}$$

$$\Delta A_{270}/\text{min} = 0,6233;$$

0,0031 – це коефіцієнт фінальної абсорбції;

d – це 1 см;

TV/SV – це відношення загального об'єму до об'єму субстрату [47].

2.2.3. Визначення активності активатора плазміногену

Визначення активності активатора плазміногену проводили у плазмі крові. Забір біологічного матеріалу здійснювали у пробірку з антикоагулянтом (3,8 % цитрат натрію) у співвідношенні 9:1. Далі кров центрифугували при 4000 об/хв протягом 15 хвилин (за температури 4°C). Послідовність дії умовно можна поділити на три етапи: підготовчий, власне дослід та обрахунковий.

Підготовчий етап – це отримання еуглобінової фракції плазми. Для цього до плазми об'ємом 0,1 мл додавали 0,9 мл охолодженої дистильованої води і 0,1 мл 0,25% оцтової кислоти. Інкубували отриманий розчин одну годину при температурі 4°C. Далі центрифугували 10 хвилин при 300 об/хв. Після цього осад декантували і розчиняли в 0,1 мл 0,05 М трис-HCl буфері (pH 7,4) з 0,15 М NaCl.

Власне дослід: формували дослідні та контрольні зразки. В лунки мікропланшету вносили по 0,001 мл: еуглобулінової фракції плазми; плазміноген (Glu-plasminogen), концентрацією 1,25 мг/мл та фібрин (desAB-fibrin), концентрацією 3 мг/мл. У контрольний зразок додавали стандартний препарат активатора плазміногену (rtPA, Actilyse; Boehringer Ingelheim International, GmbH) замість еуглобулінової фракції плазми. Ініціювали реакцію, додаючи в лунки 0,220 мл 0,05 М трис-HCl буферу (pH 7,4), до якого попередньо додавали 0,01 % твін-80 і 0,025 мл 3 mM S2251 (H-D-Val-L-Leu-L-Lys-p-нітроанілід). Загальний об'єм інкубаційного середовища складав 0,25 мл. Проводили інкубацію протягом 150 хвилин,

зупиняли процес внесенням 0,025 мл 50 % оцтової кислоти. Вимірювали рівень абсорбції п-нітроаніліда на мікрорідері («Multiskan EX Termo», Китай) при довжині хвилі 405 і 495 нм.

Заключний етап – розрахунковий. Кількість одиниць тканинного активатора плазміногену в 1 мл інкубаційного середовища визначали за калібрувальною кривою. Її будували, використовуючи стандартний розчин активатора. Готували його наступним чином: розчин активатора (активність 580000 IU/ мг) розчиняли в 0,2 М натрій ацетатному буфері (рН 5,1). Такий розчин можна зберігати у холодильнику (за температури 4°C) протягом чотирнадцяти днів. Безпосередньо перед дослідом готували вихідний розчин, активність rt-PA в якому 100000 IU/мл і робочі розчини, шляхом послідовного розведення вихідного розчину в 0,05 М трис-HCl буфері (рН 7,4). Отриману інформацію з калібрувального графіку вносили у формулу (2.1) як В, за якою вираховуємо активність тканинного активатора плазміногену (А).

$$A = B \times 100 \times 0,1 \quad (2.3)$$

У формулі також використовували коефіцієнти:

100 – розрахунку розведення плазми в пробі;

1,1 – перерахунку розведення плазми цитратом натрію [49].

2.2.4. Визначення окислених протеїнів в ліпопротеїнах високої та низької густини

Метод визначення окислених протеїнів у складі ліпопротеїнових фракцій базується на реакції утворення комплексів динітрофенілгідразинів зі сполучення окислених протеїнів та 2,4-динітрофенілгідразину, що реєструються спектрофотометрично.

Для досліджень зі зразку крові, об'ємом 5 мл крові отримували 2 мл сироватки. До сироватки додавали, нашаровуючи шприцом, 0,6 мл фізіологічного розчину та центрифугували 15 хвилин при 8000 об/хв. Сироватку потім обережно видаляли шприцом з-під сольового шару та в ній визначали кількість ліпопротеїнів низької та дуже низької густини. Для цього

вимірювали оптичну густину сироватки при довжині хвилі 700 нм в кюветі. У контрольному зразку в кюветі містилась дистильована вода.

Далі до сироватки додавали преципітант фірми «Согмау» у співвідношенні 1:10, та через 15 хвилин визначали оптичну густину в тих самих умовах проти води. Різниця між значеннями спектрофотометрування зразків у першому і другому досліді визначала оптичну густину ліпопротеїнів низької та дуже низької густини. Потім вимірюваний розчин центрифугували 15 хвилин при 8000 об/хв.

Для наступного кроку визначення окиснювальної модифікації білків у фракціях ліпопротеїнів виокремлювали фракцію ліпопротеїнів високої та низької густини об'ємом 0,1 мл і проводили ряд послідовних дій. Спочатку проводили осадження фракції 20% трихлороцетовою кислотою в об'ємі 0,9 мл. Наступним кроком було додавання до зразків 0,1М 2,4-динітрофенілгідразину об'ємом 1 мл, попередньо розчиненого в 2Н НСІ і етиловому спирті та витриманому на киплячій водяній бані до повного розчинення 2,4-динітрофенілгідразину. В контрольний зразок додавали 1 мл 2Н НСІ, замість 2,4-динітрофенілгідразину. Далі зразки інкубували при кімнатній температурі (20 °С) протягом однієї години.

Потім проводили центрифугування при 6000 об/хв. протягом 15 хвилин. Осад промивали розчином етанол-етилацетату (1:1) і центрифугували за 6000 об/хв протягом 15 хвилин для екстракції ліпідів та 2,4-динітрофенілгідразину, які не прореагували з карбонільними групами окислених білків. Такі дії повторювали тричі.

Отриманий осад підсушували для усунення залишкового розчинника етанол-етилацетату, який згодом розчиняли в 8М розчині сечовини. Об'єм сечовини, яку додавали до осаду, дорівнювала 4 мл. Отриману суміш витримували на киплячій водяній бані протягом п'яти хвилин до повного розчинення.

Оптичну густину отриманих динітрофенілгідразинів з фракції ліпопротеїнів високої та низької густини реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 370 нм [47].

2.2.5. Визначення індексу перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів

Для розрахунку індексу зі зразку крові, об'ємом 5 мл крові отримували 2 мл сироватки. До сироватки додавали, нашаровуючи шприцом, 0,6 мл фізіологічного розчину та центрифугували 15 хвилин при 8000 об/хв. Сироватку потім обережно видаляли шприцом з-під сольового шару та в ній визначали кількість ліпопротеїнів низької та дуже низької густини. Для цього вимірювали оптичну густину сироватки при довжині хвилі 700 нм в кюветі (д1). Контрольний зразок містив бідистильовану воду. Далі до сироватки додавали преципітант фірми «Согмау» у співвідношенні 1:10, та через 15 хвилин визначали оптичну густину в тих самих умовах проти контролю – бідистильованої води (д2). Різниця між значеннями спектрофотометрування зразків у першому і другому досліді (д1-д2) визначала оптичну густину ліпопротеїнів низької та дуже низької густини (Д1).

Потім вимірюваний розчин центрифугували 15 хвилин при 8000 об/хв. Надосадну рідину зливали, оскільки це була фракція ліпопротеїнів високої густини. В осад додавали суміш гептан-ізопропіловий спирт (1:1) у співвідношенні 1:5. Струшували реакційну суміш протягом п'яти хвилин. Потім зразки центрифугували 10 хвилин при 4000 об/хв. Відбирали надосадну фракцію і додавали до неї воду у співвідношенні 10:1. Після струшування та розподілу фракцій відбирали лише верхню фракцію. До нижньої фракції додавали етиловий спирт у співвідношенні 1:5.

Оптичну густину отриманого розчину вимірювали на спектрофотометрі (дейтерієва лампа) при 232 нм в кюветі 1 см (Д2). В якості контролю використовують екстрагуючий розчин (гептан-ізопропіловий спирт). Розрахунок індексу перекисної модифікації (ІПМ) ліпопротеїнів низької та дуже низької густини виконували за формулою (2.4).

$ПМ = D_2 / D_1 \times 10$ (2.4), де

D_1 – це оптична густина ліпопротеїнів низької та дуже низької густини;

D_2 – оптична густина діє нових кон'югатів [43].

2.2.6. Визначення загального холестеролу в сироватці крові за методом Ілька

Принцип методу полягає у тому, що холестерол в присутності оцтового ангідриду, суміші оцтової та сірчаної кислот дає зелене забарвлення, інтенсивність якого прямо пропорційна вмісту продукту, що досліджується.

На початку потрібно було виготовити необхідні реактиви: реактив Лібермена-Бурхарда, стандартний розчин холестеролу, абсолютний етиловий спирт.

Реактив Лібермена-Бурхарда – це суміш крижаної оцтової кислоти і оцтового ангідриду та концентрованої сульфатної кислоти у співвідношенні 1 : 5 : 1. Складові додавали у такому ж порядку з періодичним помішуванням.

Для приготування стандартного розчину холестеролу (4,7 ммоль/л) зважували 180 мг холестеролу. Далі наважку розчиняли у 2,5 мл хлороформу. Отриманий розчин переносили у мірну колбу, об'ємом 100 мл та доводили до мітки етиловим спиртом.

Абсолютний етиловий спирт виготовляли за допомогою сульфату міді, яку отримували прокалюванням кристалічної солі (мідного купоросу) при 120°C в сушильній шафі при періодичному перемішуванні. Порошок заливали 96 % етиловим спиртом і залишали на 3-4 дні. Кожного дня розчин перемішували. Частинки, що перебувають в осаді, поступово набували синього забарвлення, утворюючи кристалогідрати.

Потім спирт зливали та засипали новою порцією безводного сульфату міді. Процедуру зневоднення етанолу проводили до моменту, коли колір осаду перестав змінюватися. Спирт під час цих перетворень зливали і фільтрували, слідкуючи за герметичністю посуду.

Методика визначення передбачала додавання 0,1 мл негемолізованої сироватки до 2,1 мл реактиву Лібермена-Бурхарда. Сироватку додавали дуже

повільно, так, що б вона стікала по стінкам пробірки. Лише тоді розчин отримував чисте смарагдове забарвлення.

Потім зразки ретельно перемішували та термостатували двадцять хвилин при 37°C. Отриману суміш колориметрували на ФЕК 2 з червоним світлофільтром при довжині хвилі від 630 до 690 нм в кюветі з шириною шару 5 мм.

Показники абсорбції аналізували в порівнянні зі значенням контрольного зразку, що повністю складався з реактиву Лібермена-Бурхарда. Для побудови калібрувального графіку з стандартного розчину холестеролу готували ряд розведень, які відповідали відомим концентраціям у розчині (табл. 2.2).

Окремі зразки зі стандартним розчином так само як дослідні спершу струшували та термостатували, а потім колориметрували.

За калібрувальним графіком, що будували за значеннями зразків зі стандартним розчином, визначали результати концентрації загального холестеролу у дослідних зразках [47].

Таблиця 2.2

Порядок розведення зразків стандартного розчину холестеролу для побудови калібрувального графіку

№ зразку	Об'єм стандартного розчину холестеролу, мл	Об'єм реактива Лібермена-Бурхарда, мл	Концентрація холестеролу, ммоль/л
1	0,05	2,15	2,3
2	0,10	2,10	4,7
3	0,15	2,05	7,0
4	0,20	2,00	9,3
5	0,26	1,95	11,6

2.2.7. Визначення триацилгліцеролів в сироватці колориметричним методом

Принцип методу полягає в тому, що триацилгліцероли екстрагують з сироватки крові і за реакцією утворенням 3,5-диацил-1,4-дигідроліютидина спектрофотометрично визначається кількість досліджуваних ліпідів. Звільнений в результаті лужного гідролізу гліцерол окислюють до формальдегіду за допомогою метаперіодатунатрія. Утворений формальдегід взаємодіє з ацетилацетоном 3,5-диацил-1,4-дигідроліютин з утворенням кольорової сполуки, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту триацилгліцеролів.

Перед початком визначення проводили підготовку реактивів: гептану, ізопропілового спирту, сульфатної кислоти (0,04 моль/л 2,2 мл концентрованої сульфатної кислоти доводять до одного літру дистильованою водою), розчину їдкого калію (6,25 моль/л 17,5 г КОН розчиняють у дистильованій воді), періодатний реактив, розчину ацетату амонію, ацетилацетонового реактиву та стандартний розчин тріолеїна. Періодатний реактив готують внесенням 0,6 г натрію йоднокислого (NaIO_4) в 100 розчину оцтової кислоти (50 г/л).

Для виготовлення розчину ацетату амонію потрібно 2 моль/л 154 г оцтовокислого амонію розчинити у невеликій кількості дистильованої води, а потім, у мірній колбі, довести загальний об'єм до одного літру. Значення водневого показника розчину дорівнювало значення 8,6.

Для приготування ацетилацетонового реактиву необхідно 1,5 мл ацетоацетону, до якого доливали 2 моль/л розчину ацетату амонію до позначки 200 мл.

В даній методиці використовували стандартний розчин тріолеїну (2,2 моль/л). Його готували у мірній колбі, об'ємом на 1000 мл, куди вносили 200 мг тріолеїну і доливали до позначки ізопропіловим спиртом.

Для проведення експерименту до 0,5 мл сироватки додавали 2,0 мл гептану, до них – ще 3,5 ізопропілового спирту і 1,0 мл сульфатної кислоти. Перемішували протягом двадцяти секунд та на п'ять хвилин залишали для

інкубації при кімнатній температурі. Далі центрифугували десять хвилин при 3000 об/хв.

До 0,4 мл отриманої надосадової рідини в результаті центрифугування додавали 2,0 мл ізопропілового спирту і одну краплину КОН. Зразки закривали короком і нагрівали у водяній бані при 70°C протягом десяти хвилин. Після охолодження зразків до них додавали 0,2 мл перйодатного і 1,0 ацетилацетатного реактиви. Отриману суміш ретельно перемішували після чого знову нагрівали протягом десяти хвилин у водяній бані при 70°C.

Контрольний зразок готували так само як дослідний, але замість сироватки додавали дистильовану воду.

У наступному кроці визначали оптичну густину на фотометрі з синім чи фіолетовим світлофільтром при довжині хвилі 425 нм в кюветі з шириною шару 5 мм [47].

2.2.8. Визначення холестеролу, що пов'язаний з ліпопротеїнами високої густини

Принцип методу базується на відокремленні фракцій ліпопротеїнів низької та дуже низької густини і виявленні холестеролу, який пов'язаний з ліпопротеїнами високої густини, що залишається в надосадовій рідині. Молекули ліпопротеїнів низької та дуже низької густини їх ремнантів здатні утворювати комплекси з гепарином у присутності іонів марганцю та випадати в осад, на противагу їм, ліпопротеїни високої густини залишаються в надосадовій рідині.

Для проведення досліду до 1 мл сироватки додавали 0,04 мл розчину гепарину (5000 ЕД/мл) та ретельно перемішували. Наступним кроком – було додавання розчину 2 моль/л хлорного марганцю ($19,791 \text{ г MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ в 50 мл дистильованої води). Отриману суміш перемішували та центрифугували 15 хвилин при 1500 об/хв. Надосадову рідину відбирали та використовували об'єм 0,1 мл для подальшого визначення, а саме колориметрування на ФЕК 4/2 з червоним світлофільтром при довжині хвилі від 630 до 690 нм в кюветі з шириною шару 5 мм.

Результати множили на коефіцієнт 1,09, що враховує ступінь розведення плазми при додаванні до неї вище зазначених реагентів [57].

2.2.9. Метод визначення холестеролу, що пов'язаний з ліпопротеїнами низької густини

Дослідження у ліпопротеїнах розподілу холестеролу передбачає визначення рівню загального холестеролу, триацилгліцеролів та холестеролу і протеїнів високої густини. На основі отриманих даних розраховують кількість холестеролуліпопротеїнів низької густини (чи β -холестеролу) та холестеролу ліпопротеїнів дуже низької густини (чи пре- β -холестеролу). Для цього першочергово визначали рівень холестеролу ліпопротеїнів дуже низької густини ($X_{C_{ЛПДНГ}}$) шляхом ділення показника концентрації триацилгліцеролів (ТГ) на 2,2. Тобто формула (2.5) являтиме собою:

$$X_{C_{ЛПДНГ}} = ТГ / 2,2 \quad (2.5)$$

Розрахунок за цією формулою (2.5) базується на двох концепціях. По-перше, у більшості пацієнтів після 12-годинного голодування практично усі триацилгліцероли зосереджені у ліпопротеїнах дуже низької густини. По-друге, в частках ліпопротеїнів дуже низької густини на 22 молекули триацилгліцеролів завжди, в середньому, знаходиться 10 молекул холестеролу. Даний розрахунок підходить для нормальної концентрації триацилгліцеролів у крові людей, що не перевищує 4,4 ммоль/л.

Таким чином, орієнтуючись на концентрацію триацилгліцеролів, холестеролу ліпопротеїнів високої густини ($X_{C_{ЛПВГ}}$) визначали за наступною формулою (2.6).

$$X_{C_{ЛПВГ}} = X_{C_{Заг}} - (X_{C_{ЛПВГ}} + X_{C_{ЛПДНГ}}) \quad (2.6), \text{ де}$$

$X_{C_{Заг}}$ – загальний холестерол;

$X_{C_{ЛПВГ}}$ – холестерол ліпопротеїнів високої;

$X_{C_{ЛПДНГ}}$ – холестеролу ліпопротеїнів дуже низької густини [57].

2.2.10. Визначення коефіцієнту атерогенності

Результати дослідження вмісту та концентрації триацилгліцеролів, холестеролу ліпопротеїнів високої та низької густини використовували для

визначення коефіцієнту атерогенності (КА), який відображає баланс між ліпідними та протеїновими фракціями між двома функціонально відмінними класами [57]. Його значення дозволяють виявляти дисліпопротеїнемію на ранніх стадіях та контролювати її при патології. КА вираховується за формулою (2.7), у якій використані наведені вище позначення:

$$КА = (ХС_{заг} - ХС_{лпвг}) / ХС_{лпвг} \quad (2.7)$$

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення кількісних показників обміну ліпідів та ліпопротеїнів, а саме вміст загального холестеролу, холестеролу у складі ліпопротеїнів низької та високої густини, триацилгліцеролів

При дослідженні в умовах ХСН особливостей ліпідного обміну було виявлено не суттєві порушення.

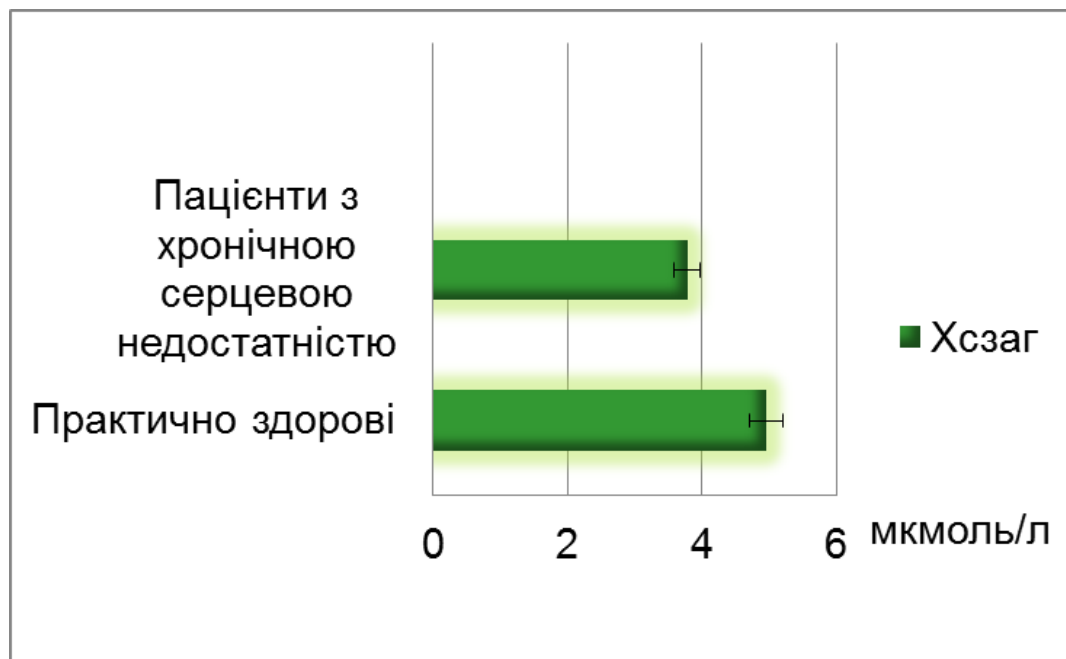


Рис. 3.1. Вміст загального холестерину у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

При проведенні дослідження, отримали результати: вміст загального холестерину у хворих на хронічну серцеву недостатність – 3,78 мкмоль/л, у практично здорових (контроль) – 4,95 мкмоль/л. У хворих на ХСН вміст загального холестерину в крові не перевищував нормальних значень, проте був достовірно нижчим, ніж у осіб контрольної групи. Низький рівень загального холестерину може бути маркером прогресування порушених метаболічних можливостей організму і важкого загального стану у хворих ХСН. Застійні явища, порушення функції паренхіматозних органів, особливо печінки, з втратою її синтетичних властивостей, традиційно вважаються характерними для синдрому ХСН і посилюються з віком [17].

Низький рівень холестерину є несприятливим прогностичним маркером у хворих на ХСН. Знижений рівень холестерину може відображати більш прогресуючу хворобу і, таким чином, бути маркером гіршого прогнозу. Низький рівень холестерину може відображати зменшене споживання їжі та зменшене всмоктування через набряк кишечника і, можливо, є наслідком посиленого метаболічного стресу [22].

Група вчених з Великобританії підтвердили гіпотезу про те, що більш низькі, а не вищі рівні загального холестерину пов'язані з поганим клінічним результатом у пацієнтів з ХСН [25].

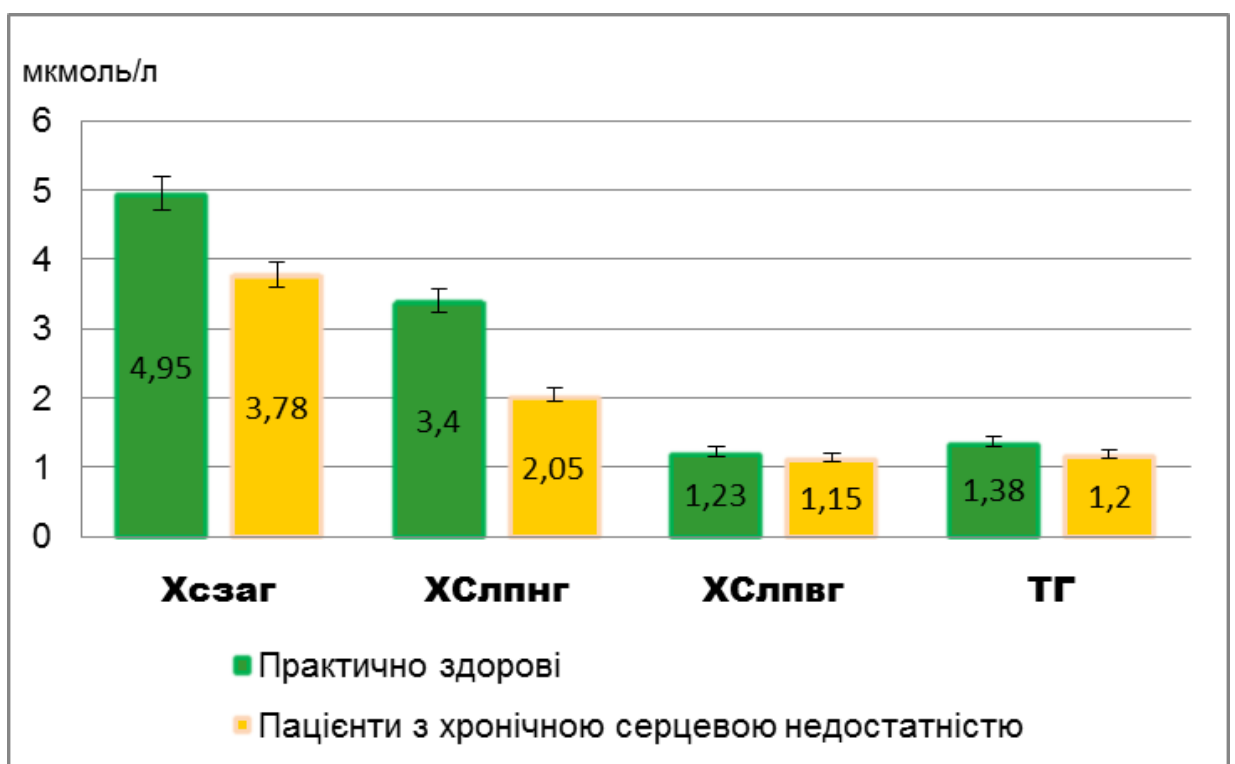


Рис. 3.2. Кількісні показники обміну ліпідів та ліпопротеїнів у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

У результаті проведених досліджень, показники ХС ЛПНГ незначно понижені у межах фізіологічних норм (менше 2,6 мкмоль/л) порівняно з контрольною групою. Рівень холестерину ліпопротеїдів низької густини проявляє тенденцію до зниження – 2,05 мкмоль/л порівняно з контрольною групою. Знижений рівень ХС ЛПНГ не використовується в діагностиці через низьку специфічність. Визначення рівня ЛПНГ необхідно для призначення

довготривалого лікування, метою якого є зниження концентрації ліпідів. ХС ЛПНГ підвищують ризик утворення атеросклеротичних бляшок на стінках судин. За даними метааналізу багатьох досліджень, зниження рівня ЛПНГ на кожен 1,0 ммоль/л асоціюється з відповідним зменшенням показників серцево-судинної смертності на 20 - 25 %. У недавньому дослідженні підтверджено, що зниження рівня ХС ЛПНГ до $< 1,8$ ммоль/л корелює зі зменшенням ризику повторних серцево-судинних подій [2].

Також зниження рівня ХС ЛПНГ пояснюється тим, що застійні явища, порушення функції паренхіматозних органів, особливо печінки, з втратою її синтетичних властивостей, традиційно вважаються характерними для синдрому ХСН і ускладнюються з віком. Внаслідок цього у хворих з ХСН, в тому числі ішемічної етіології, може знижуватися, а іноді істотно, рівень ХС і ЛПНГ.

Високий рівень ЛПНГ пов'язаний із підвищеним ризиком серцевих захворювань та інсульту. ЛПНГ транспортує холестерин до артерій, і коли рівень ЛПНГ підвищений, цей холестерин може накопичуватися в стінках судин і сприяти утворенню нальоту [12].

Досліджено рівень холестерину ліпопротеїдів високої густини: спостерігається незначне зниження показників – 1,15 мкмоль/л порівняно з контрольною групою – 1,23 мкмоль/л. ХС ЛПВГ захищають судини від появи атеросклеротичних уражень. Рівень холестерину ЛПВГ $< 0,9$ мкмоль/л вказує на підвищений ризик ХСН у пацієнта, навіть якщо загальний рівень холестерину при цьому не збільшений, тоді як рівень холестерину ЛПВГ 1,6 мкмоль/л розцінюється як зменшений ризик ХСН. Чим вище кількість ХС ЛПВГ, тим нижчий ризик виникнення ХСН [14,15].

Визначення показників тригліцеридів показало результати, які вважаються частково задовільними в межах фізіологічної норми (менше 1,7 мкмоль/л). У пацієнтів з ХСН рівень ТГ становить 1,2 мкмоль/л, у практично здорових – 1,38 мкмоль/л. Проте, відмічають, що зниження концентрації тригліцеридів має діагностичне значення при гіполіпопротеїнеміях, гіпертиреозі, синдромі мальабсорбції. Також, зниження рівня тригліцеридів

може бути наслідком асоційованих факторів під час ХСН: розвинуті стани скупчення в шлунково-кишковій системі та печінці, зменшене споживання їжі, збільшення кахексії та підвищення рівня запалення. Зниження рівня тригліцеридів у сироватці крові є провісником серцево-судинної смерті у пацієнтів із серцевою недостатністю, причини низьких рівнів тригліцеридів невідомі і потребують подальшого дослідження.

3.2. Визначення коефіцієнту атерогенності

Атерогенні показники, коефіцієнт атерогенності та серцевий ризик є потужними показниками ризику серцевих захворювань: чим вище значення, тим вищий ризик розвитку ХСН і навпаки. Багато досліджень показали, що атерогенні показники, атерогенний коефіцієнт та серцевий ризик є основними факторами ризику розвитку атеросклеротичної судинної хвороби та її ускладнень [6].

За значенням коефіцієнту атерогенності можна здійснювати контроль ефективності терапії і дієти. Коефіцієнт атерогенності нижче норми (менше 3-х) не має клінічного значення. При розрахунку коефіцієнта атерогенності відхилення безпосередньо можуть варіюватися як у бік підвищення, так і у бік зниження показника [16]. Коли коефіцієнт атерогенності не перевищує нормальних значень або його рівень нижче норми, ймовірність виникнення серцево-судинної патології прагне до нуля. При рівні коефіцієнта атерогенності більше 4 значно збільшується ймовірність виникнення ішемічних змін життєво важливих органів, тромбозів. Коефіцієнт атерогенності більше 5 свідчить про наявність атеросклеротичних змін судинного русла.

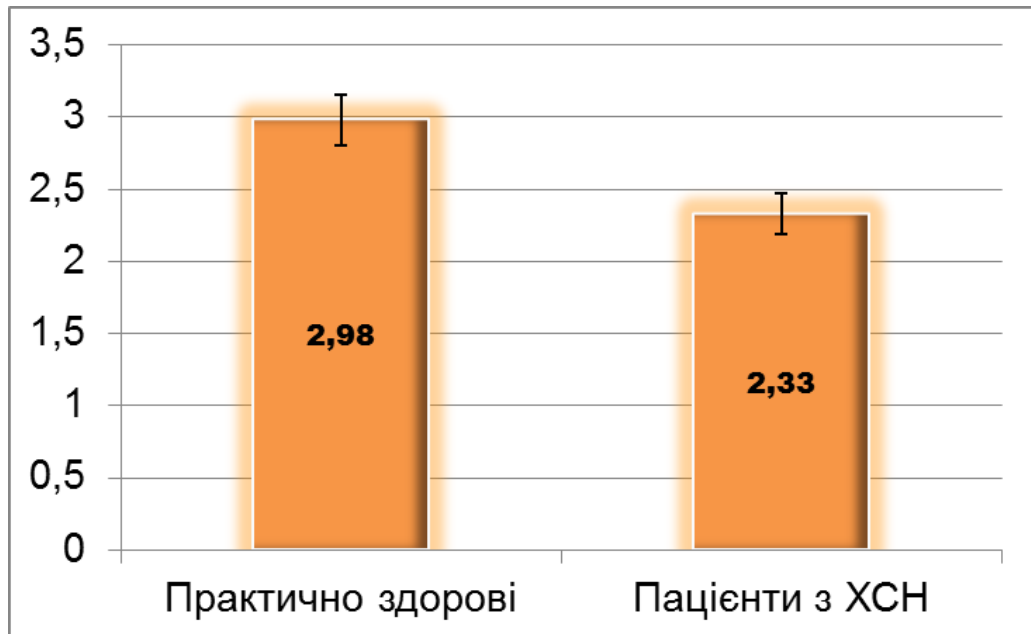


Рис. 3.3. Показники коефіцієнту атерогенності у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

Рівень КА зазнавав незначні зміни від показників контрольної групи. За результатами досліджу, отримано результат коефіцієнту атерогенності нижче норми (менше 3-х) – 2,33, який не має клінічного значення.

3.3. Визначення якісного стану ліпопротеїнів високої густини за активністю асоційованих з ними ензимів, зокрема параоксонази-1 та мієлопероксидази

Проведені дослідження показали, що в пацієнтів спостерігається значне зменшення активності параоксонази-1 (2,17 кU/л) порівняно з контрольною групою (5,8кU/л).

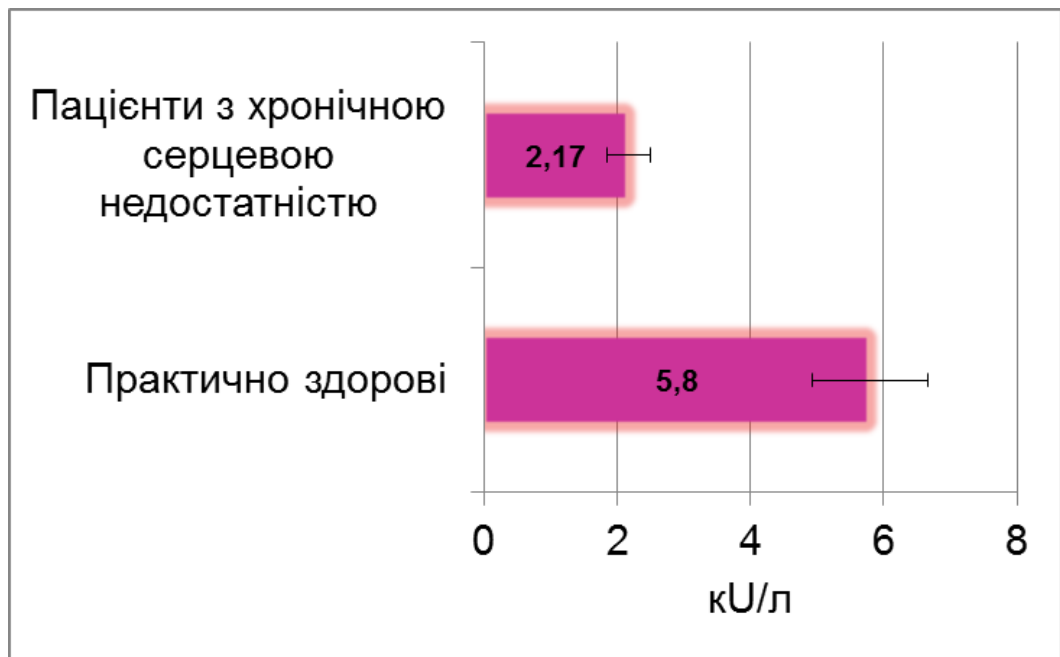


Рис. 3.4. Показники активності параоксонази-1 у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

Вибір групи пацієнтів літнього віку свідчить про те, що циркулюючі концентрації ПОН-1 змінюються у залежності від віку; вік, що призводить до зниження рівня активності ферменту.

Гідролізуючи пероксили ліпідів, параоксоназа-1 сприяє елімінації окиснених ЛПНГ, інгібуванню біосинтезу холестерину і стимуляції ЛПВГ-опосередкованого виходу холестерину із макрофагів, перешкоджаючи акумуляції холестерину і окистеролів у клітинах. Крім того, параоксоназа-1 захищає власне самі ЛПВГ від надмірної ліпідної пероксидації та разом із іншими ЛПВГ-асоційованими білками і ферментами визначає антиоксидантні, протизапальні та антиатерогенні властивості ЛПВГ. Зменшення арилестеразної активності параоксонази-1 відбувається на тлі зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, зокрема ТБК-позитивних продуктів (МДА) в сироватці крові [9,48].

Проведені дослідження показали, зростання активності мієлопероксидази 0,0035 ум.од./хв порівняно з контрольною групою (0,0024 ум.од./хв).

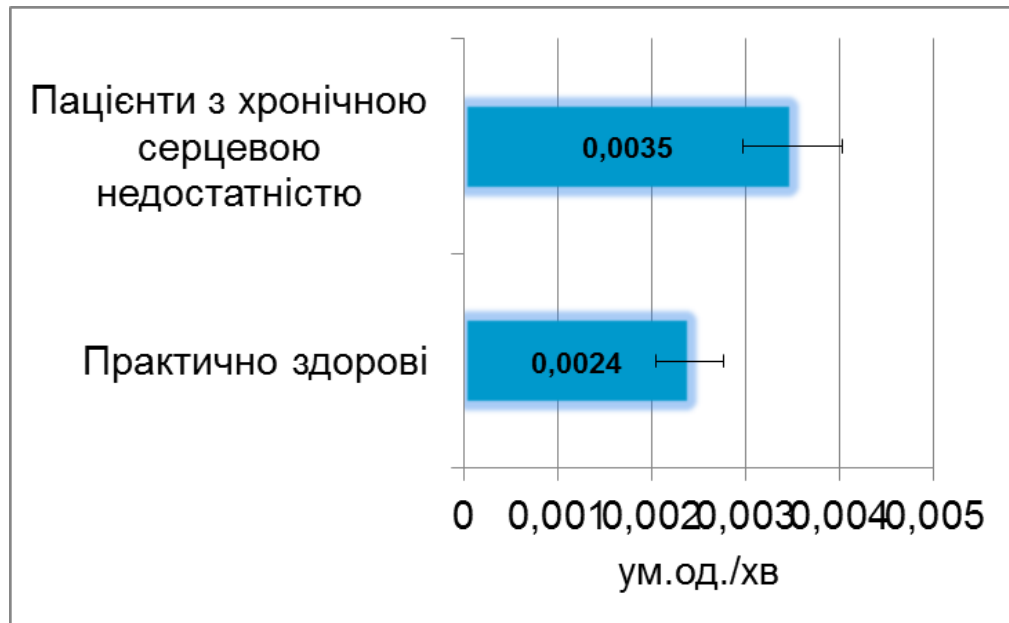


Рис. 3.5. Показники активності мієлопероксидази у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

Продемонстроване зростання активності МПО вказує на наявність запальної реакції.

В кровообігу мієлопероксидаза утворює комплекс з ЛПВГ-асоційованим ферментом параоксоназою-1. ПОН-1 частково інгібує активність мієлопероксидази. МПО здатна інактивувати параоксоназу-1, окиснюючи залишок тирозину-71, що призводить до порушення зв'язку молекули ферменту з ЛПВГ. Під час активації МПО утворюється низка активних форм кисню, що може призводити до пошкодження макромолекул, ліпопротеїнів. Під час зв'язування МПО з ендотелієм та її активації можливе локальне загострення запалення судин [21].

Зміна активності ПОН-1 і МПО може бути використана як предиктор активності запальної реакції за участі нейтрофільних лейкоцитів і атеросклеротичного процесу, а також для оцінки ефективності лікування [56].

3.4. Аналіз стану ліпопротеїнів низької та високої густини за ступенем їх окиснення

Отримані дані дослідження аналізу стану ліпопротеїнів низької та високої густини за ступенем їх окиснення демонструють значно підвищенні показники окиснення порівняно з контрольною групою. Показано, що окиснення ЛПНГ у

дослідній групі дорівнює 0,94 ум.од./л, що є значно вищим порівняно з контролем (0,54 ум.од./л). Також, результати окиснення ЛПВЩ демонструють підвищений рівень, 3,5 ум.од./л порівняно з контролем (1,94 ум.од./л).

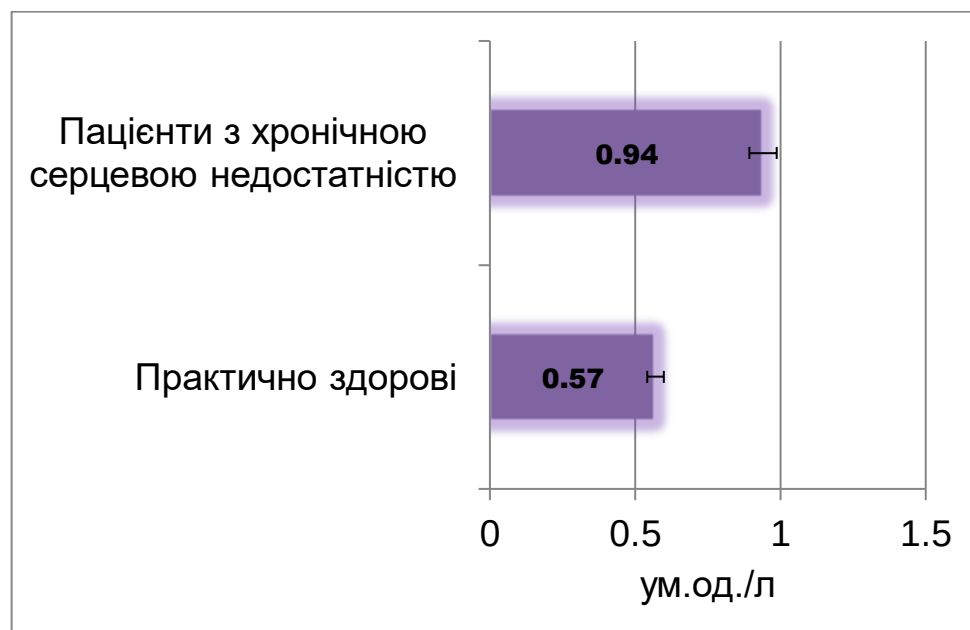


Рис. 3.6. Стан ліпопротеїнів низької густини за ступенем їх окиснення у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

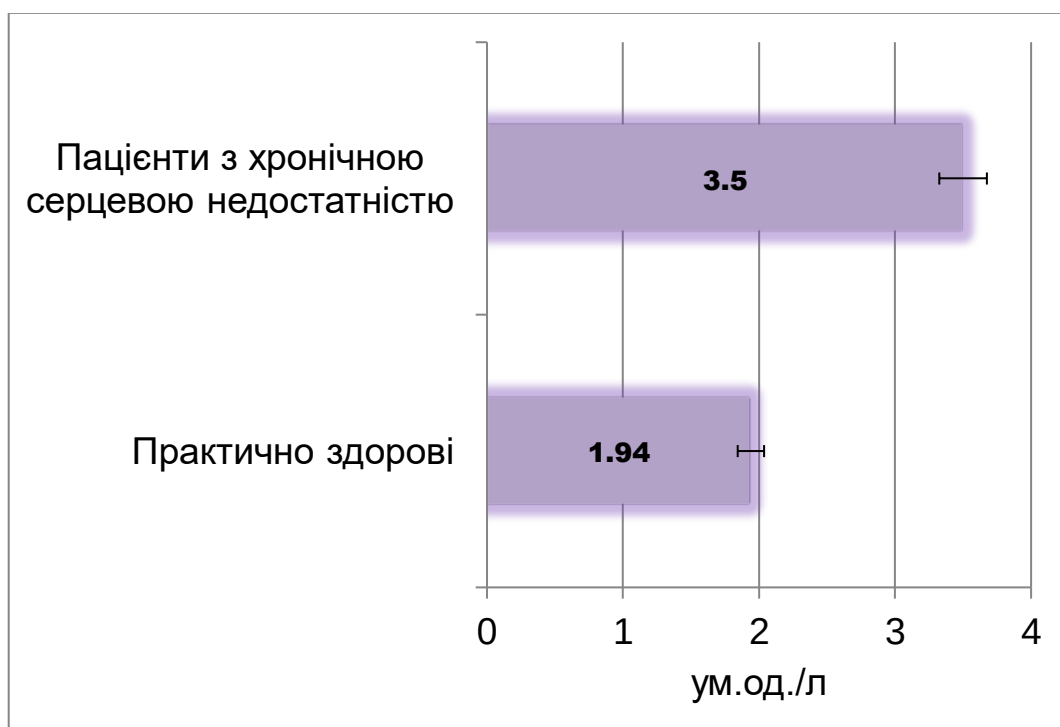


Рис. 3.7. Стану ліпопротеїнів високої густини за ступенем їх окиснення у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

Показано, що підвищення рівня ЛПНГ викликає запальні реакції шляхом активації багатьох типів клітин судинної стінки, включаючи макрофаги, гладком'язові клітини та ендотеліальні клітини, припускаючи, що ці реакції є сильним фактором сприяння формуванню атеросклеротичного ураження [41]. І також дуже ймовірно, що реакції на запалення збільшують вироблення реактивних видів кисню (ROS) і, таким чином, можуть ініціювати реакції окислення поліненасичених жирних кислот. Також припускають, що ЛПНГ окислюються навіть за відсутності атеросклеротичних уражень, і що ЛПНГ може бути залучений до подальшого розвитку уражень [18,30].

Встановлено, що однією із важливих причин підсилення окисних процесів за умов ХСН є зниження активності супероксиддисмутази. Також посилене окиснення сприяє пошкодженню судинної стінки, кардіоміоцитів, зміні адгезивно-агрегаційних властивостей клітин крові.

Універсальним механізмом вказаних змін ліпідної структури мембран за умов ХСН може бути інтенсифікація вільнорадикальних процесів окислення, що встановлена в наших дослідженнях. Зростання концентрації продуктів перекисного окиснення може означати, що оксидантний стрес є не лише пусковим механізмом атерогенезу, а й відіграє суттєву роль при прогресуванні хронічної серцевої недостатності [31,32].

3.5. Визначення індексу перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів

В даний час активація вільнорадикальних окислювальних процесів і розвиток оксидантного стресу визнається одним з найважливіших патогенетичних механізмів різних серцево-судинних захворювань.

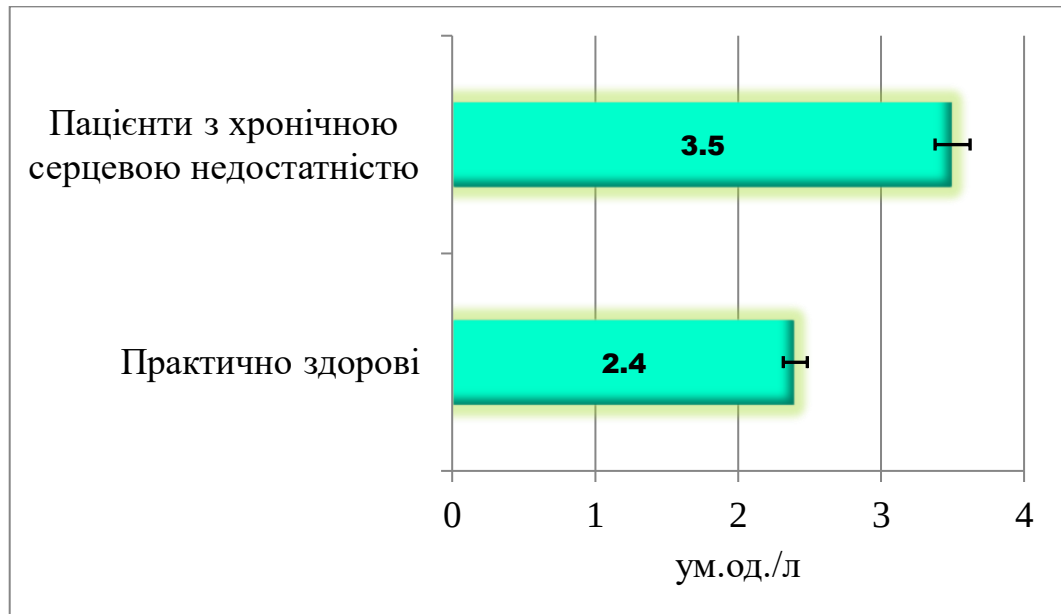


Рис. 3.8. Індекс перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів у пацієнтів з ХСН та практично здорових людей

Привертає увагу достовірно вища – 3,5 ум.од./л за контроль – 2,4 ум.од./л на величина ІПМАЛП через накопичення в них продуктів переокислення ліпідів і білків. Таким чином, закономірно зростає індекс перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів (ІПМАЛП), який відображає ступінь активації процесів ПОЛ безпосередньо в ЛПНГ та ЛПДНГ [24,51].

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Серцево-судинні захворювання є однією з найважливіших проблем охорони здоров'я всіх розвинутих країн світу, їх характеризує широке поширення, підвищення рівню інвалідизації та смертності хворих. Незважаючи на достатній прогрес у вивченні патогенезу, клініки, діагностики та лікування, хронічна серцева недостатність залишається найпоширенішим захворюванням із численними ускладненнями як в Україні, так і в усьому світі.

При проведенні дослідження визначення кількісних показників обміну ліпідів та ліпопротеїнів, а саме вміст загального холестеролу, холестеролу у складі ліпопротеїнів низької та високої густини, триацилгліцеролів отримали результати: вміст загального холестерину у хворих на хронічну серцеву недостатність – 3,78 мкмоль/л, у практично здорових (контроль) – 4,95 мкмоль/л. У хворих на ХСН вміст загального холестерину в крові не перевищував нормальних значень, проте був достовірно нижчим, ніж у осіб контрольної групи. Рівень холестерину ліпопротеїдів низької густини проявляє тенденцію до зниження – 2,05 мкмоль/л порівняно з контрольною групою. Досліджено рівень холестерину ліпопротеїдів високої густини: спостерігається незначне зниження показників – 1,15 мкмоль/л порівняно з контрольною групою – 1,23 мкмоль/л. Визначення показників тригліцеридів показало результати, які вважаються частково задовільними в межах фізіологічної норми (менше 1,7 мкмоль/л). У пацієнтів з ХСН рівень ТГ становить 1,2 мкмоль/л, у практично здорових – 1,38 мкмоль/л.

Рівень КА зазнав незначні зміни від показників контрольної групи. За результатами досліджу, отримано результат коефіцієнту атерогенності нижче норми (менше 3-х) – 2,33, який не має клінічного значення.

Проведені дослідження показали, що в пацієнтів спостерігається значне зменшення активності параоксонази-1 (2,17 кU/л) порівняно з контрольною групою (5,8кU/л).

Проведені дослідження показали, зростання активності мієлопероксидази 0,0035 ум.од./хв порівняно з контрольною групою (0,0024 ум.од./хв).

Отримані дані дослідження аналізу стану ліпопротеїнів низької та високої густини за ступенем їх окиснення демонструють значно підвищенні показники окиснення порівняно з контрольною групою. Показано, що окиснення ЛПНГ у дослідній групі дорівнює 0,94 ум.од./л, що є значно вищим порівняно з контролем (0,54 ум.од./л). Також, результати окиснення ЛПВЩ демонструють підвищений рівень, 3,5 ум.од./л порівняно з контролем (1,94 ум.од./л).

Величина ІПМАЛП достовірно вища – 3,5 ум.од./л за контроль – 2,4 ум.од./л на через накопичення в них продуктів перекислення ліпідів і білків.

ВИСНОВКИ

- 1) Встановлено пониження показників обміну ліпідів та ліпопротеїнів, які свідчать про наявні проблеми серцево-судинної системи.
- 2) Зменшення арилестеразної активності параоксонази-1 відбувається на тлі зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів.
- 3) Зростання активності МПО вказує на наявність запальної реакції.
- 4) Зростання концентрації продуктів перекисного окиснення може означати, що оксидантний стрес є не лише пусковим механізмом атерогенезу, а й відіграє суттєву роль при прогресуванні хронічної серцевої недостатності.
- 5) Закономірне зростання індексу перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів сигналізує про накопичення в них продуктів перекислення ліпідів і білків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Berry C., Clark A. Catabolism in chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2005. 521–32.
2. Bidzilya P., Changes of lipid metabolism in chronic heart failure depending on the degree of excess weight. *J. Clin. Exp. Med. Res.*, 2016; 4(2):303–309.
3. Bukova M., Bernadic M., Buckingham T. C-reactive protein, cytokines and inflammation in cardiovascular diseases. *Bratisl. Lek. Listy.* 2008. №8. 333–340.
4. Cheraghi M., Shahsavari G. Paraoxonase 1 Activity, Lipid Profile, and Atherogenic Indexes Status in Coronary Heart Disease. *Rep Biochem Mol Biol. Eur Heart J.* 2017. 1–7.
5. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie.* 2017 Oct 19; 132:19-27.
6. Choudhary M. Atherogenic index of plasma is related to arterial stiffness but not to blood pressure in normotensive and never-treated hypertensive subjects. 2019 March; 157-167.
7. Freitas HF, Barbosa EA, Rosa FH et al. Association of HDL cholesterol and triglycerides with mortality in patients with heart failure. *Braz J Med Biol Res*, 2009, 42(5): 420-405.
8. Gordts S., Van Craeyveld E., Muthuramu I., Singh N.. Lipid lowering and HDL raising gene transfer increase endothelial progenitor cells, enhance myocardial vascularity, and improve diastolic function. *PLoS ONE* 7(10). 2012. 96-104.
9. Hammadah M., Kalogeropoulos A. High-density Lipoprotein-Associated paraoxonase-1 Activity for Prediction of Adverse Outcomes in Outpatients With Chronic Heart Failure. *Epub* 2017 Feb 7; 4:12-16.
10. Horwich TB, Hamilton MA, Maclellan WR, Fonarow GC. Low serum total cholesterol is associated with marked increase in mortality in advanced heart failure. *J Card Fail.* 2002. 216–24.

11. Horwich TB, Hernandez AZ et al. Cholesterol levels and in-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure. *Am Heart J*. 2008. 1170-1076.
12. Kahn M., Kosmas C., Wagman G. Low Density Lipoprotein Levels in Patients With Acute Heart Failure. *Congest Heart Fail*. 2013(19): 85–91.
13. Kenchiah S, et al. Obesity and the risk of heart failure. *New. Engl. J. Med*. 2002 (347): 305–313.
14. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2014 June 15;103:341-9.
15. Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular Research*. 2014 June 15;103:350-361.
16. Kumar M. Atherogenic index of plasma is related to arterial stiffness but not to blood pressure in normotensive and never-treated hypertensive subjects. 2019.157-167.
17. Lieberman AP, Swanson JA. High Cholesterol at the Heart of Phagolysosomal Damage. *Cell Metabolism*. 2018 March 6;27(3):487-88.
18. Link J., Rohatgi A .HDL cholesterol: physiology, pathophysiology, and management. *Curr Probl Cardiol*. 2007. 268-314
19. Navar A. The Evolving Story of Triglycerides and Coronary Heart Disease Risk. *Eur Heart J*. 2019. 1-2.
20. Nichols M., Townsend N., Scarborough P., Rayner M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur. Heart J*. 34(39). 2013. 16-24.
21. Philip, K., Tong, W., Mann, S., Van Lente, F. Plasma Myeloperoxidase Levels in Patients With Chronic Heart Failure. *The American Journal of Cardiology*. 2006. 796–799.
22. Rauchhaus M, Clark A. The relationship between cholesterol and survival in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(11). 2003. 1933–1940.

23. Roger V., Weston S., Redfield M. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. JAMA. 2004. 344–350.
24. Serkova V.K., Poberezhna A.V., Romanova V.A. The indicators of the systemic inflammation in patients with coronary heart disease. World of medicine and biology. №4. 2010. 72-76.
25. Shepel R. N. «Paradoks holesterina» u patsientov s hronicheskoy serdechnoy nedostatochnostyu . Meditsinskiy sovet. 2016. No.13. 61-65.
26. Sidorov A. V. and Fateev M. M. Changes in Lipid Spectrum in Rats with Chronic Heart Failure of Different Severity on the Background of Angiotensin–Converting Enzyme Inhibitors and Beta–Adrenoblockers. Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii, 2013, Vol. 49, No. 4. 272-277.
27. Silva S. et al. Statin-induced low cholesterol is not associated with poor outcome in chronic heart failure. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 2012. 284–290.
28. Sokolenko, V. L., & Sokolenko, S. V. The interaction between lipid exchange and thyroid status in the conditions of prolonged influence of small doses of radiation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 2017, 8(2), 231–238.
29. Tobias R., Thenral S. Use of Myeloperoxidase for Risk Stratification in Acute Heart Failure. Eur Heart J. 2010. 944-951.
30. Van der Stoep M, Korporaal SJ, Van Eck M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. Cardiovasc Res. 2014 June 1;103(3):362-71.
31. Van Linthout S., Frias M., Singh N., De Geest B. Therapeutic potential of HDL in cardioprotection and tissue repair. Handb. Exp. Pharmacol. 2015. 527–565.
32. Ventura Hector O., Lavie Carl J. HDL and Heart Failure Regulation. Journal of the American College of Cardiology. 2019. 9-14.

33. Zhao Q., Li J.. Association of total cholesterol and HDL-C levels and outcome in coronary heart disease patients with heart failure. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Mar; 96(9): e6094.
34. Kenneth R Feingold. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext. 2018. 6-12.
35. Амосова Е.Н. Клиническая кардиология. В 2 т. 1998. 497с.
36. Амосова К.М., Губарь І.В. Гостра декомпенсація серцевої недостатності зі збереженою фракцією викиду: клінічна характеристика, перебіг та найближчі наслідки при порівнянні з серцевою недостатністю зі зниженою фракцією викиду (ретроспективне дослідження). *Серцева недостатність*, 2018. 201-219.
37. Березин А.Е., Кремзер А.А. Биологические маркеры в оценке риска наступления неблагоприятных клинических исходов у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ишемического генеза. *Український кардіологічний журнал* 5/2014. 88-96.
38. Бідзіля П. П. Функціональний стан лівого шлуночка при хронічній серцевій недостатності на тлі зайвої ваги залежно від рівня загального холестерину та тригліцеридів. *Світ медицини та біології*. 2016. № 4(58). 12-16.
39. Васильченко В.С., Кучменко О.Б. Якісний стан ліпопротеїнів за артеріальної гіпертензії. *Зб. наук. праць «Біологічні дослідження – 2018»* (14-16.03.2018). Житомир. ПП «Рута». 2018;261-262.
40. Васильченко В.С., Кучменко О.Б., Юсова О.І. Роль системи фібринолізу у патогенезі серцево-судинних захворювань. *Біохімія і молекулярна біологія*. 2017. 76-79.
41. Воронков Л. Г. Показники антиоксидантного захисту, оксидантної системи та системної запальної відповіді у пацієнтів із хронічною систолічною серцевою недостатністю залежно від основних клініко-інструментальних характеристик. *Укр. мед. часоп.* 2018. № 3. 44-47.

42. Воронков Л. Г., Мхітарян Л.С. Порівняльна клінічна характеристика хворих із хронічною серцевою недостатністю та зниженою фракцією викиду лівого шлуночка залежно від стану когнітивної функції. Серце і судини. 2018. № 3. 52-59.
43. Євстратова ІН, Мхітарян ЛС. Спосіб діагностики прогресуючого атеросклерозу. Пат. 30972А Україна, МПК9 А 61 К 31/00, А 61 К 36/00, А 61 К 47/00, А 61 Р 11/00; заявник і власник патенту Український науково-практичний інститут кардіології ім. М. Д. Стражеска. № 98063325; заявл. 25.06.98; опубл. 15.12.00, бюл. № 7, 2000 р
44. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998. 459 с.
45. Горбась І.М., Кваша О.О. Шляхи корекції показників ліпідного та вуглеводного обміну в пацієнтів з метаболічними порушеннями. Український кардіологічний журнал 6/2014. 72-77.
46. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., и др. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека. Биоорганическая химия. 2009;35(5):629–39.
47. Камышников ВС. Справочник по клинико-биохимической диагностике: В 2 т. Т 2. Мн.: Беларусь; 2000. 463 с.
48. Коваленко В.М, Кучменко О.Б, Мхітарян Л.С. Молекулярно-генетичні особливості функціонування параоксонази та її значення в розвитку серцево-судинної патології. Україн. Кардіол. журн. 2014;5:105-16.
49. Кондратюк АС, Юсова ОІ, Гриненко ТВ. Визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові. Лабораторна діагностика. 2011;3(57):3-9.
50. Кучменко О.Б., Мхітарян Л.С. Білкові фактори формування оксидативного статусу і розвитку патологічного стану у пацієнтів з артеріальною гіпертензією. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. Випуск 73. 303-309.

51. Мхітарян Л. С., Кучменко О. Б. Окислювальний стрес : Механізми розв. і роль в патології; ред.: Г. В. Донченко. 2004. 222 с.
52. Мхітарян Л.С., Кучменко О.Б.. Якісний стан ліпідних факторів атерогенезу та активність запальної реакції в пацієнтів, які перенесли гострий інфаркт міокарда. Український кардіологічний журнал 4/2016. 55-61.
53. Мхітарян Л.С., Орлова Н.М. Активність оксидантного стресу та особливості деяких метаболічних порушень в умовах гіпертонічної хвороби. Український кардіологічний журнал 6/2012. 118-122.
54. Нетяженко В.З., Поленова О.М. Роль запалення та інфекції в патогенезі ІХС . Клінічна фармакологія, фізіологія, біохімія. 1997. 95-101.
55. Руденко Ю.В. Рекомендації Європейського товариства кардіологів 2012 року щодо профілактики серцево-судинних захворювань у клінічній практиці. Серце і судини. 2013. № 4. 27-34.
56. Рыжкова В.Г. Маркеры сердечно-сосудистой недостаточности. 2016. 96-115.
57. Свінціцький І.А., Машковська С.І. Діагностична цінність ліпопротеїну (а) та його індексів як маркерів обструктивного ураження вінцевих артерій у пацієнтів зі стабільною ішемічною хворобою серця. Укр. Мед. Часопис, 6 (122). 2017. 1-4.
58. Талаева Т.В., Гавриш А.С., Братусь В.В. Значимость и механизмы действия воспаления как независимого фактора атерогенеза. Український кардіологічний журнал 4/2014.49-53.
59. Токмачев Р., Кравченко А., Будневский А. Роль воспаления в патогенезе хронической сердечной недостаточности. Терапевтический архив. 2016. 106-110.