

## Порівняння вмісту біомаркерів запалення у пацієнтів при стенозі сонних артерій та вивчення його змін залежно від прогресування атеросклерозу та виникнення атеросклеротичних ускладнень

I. I. Кополовець<sup>1,2</sup>, П. Штефаніч<sup>2</sup>, П. Берек<sup>2</sup>, З. Гертеліова<sup>3</sup>, П. О. Болдіжар<sup>1</sup>, В. В. Русин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ужгородський національний університет, медичний факультет,

<sup>2</sup>Клініка судинної хірургії, Східно-Словацький інститут серцево-судинних хвороб, університет П. Й. Шафарика, медичний факультет, Кошице, Словацька Республіка,

<sup>3</sup>Інститут експериментальної медицини, університет П. Й. Шафарика, медичний факультет, Кошице, Словацька Республіка

## Comparison of the inflammation biomarkers contents in the patients with the carotid arteries stenosis and studying of their changes, depending on progress of atherosclerosis and the atherosclerotic complications occurrence

I. I. Kopolovets<sup>1,2</sup>, P. Shtefanich<sup>2</sup>, P. Berek<sup>2</sup>, Z. Gerteliova<sup>3</sup>, P. O. Boldizhar<sup>1</sup>, V. V. Rusyn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uzhgorod National University, Medical Faculty,

<sup>2</sup>Clinic of Vascular Surgery, Eastern-Slovakia Institute of Cardio-Vascular Diseases, P. J. Shafaryk University, Medical Faculty, Kosice, Slovakia Republic,

<sup>3</sup>Institute of Experimental Medicine, P. J. Shafaryk University, Medical Faculty, Kosice, Slovakia Republic

### Реферат

**Мета.** Вивчити рівень гомоцистеїну та ліпопротеїн-асоційованої фосфоліпази A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) у пацієнтів при атеросклеротичному ураженні сонних артерій, оцінити його зв'язок з морфологічними змінами атеросклеротичної бляшки, ступенем стенозу та вираженістю симптомів захворювання.

**Матеріали і методи.** Проаналізовані зміни біомаркерів у 130 пацієнтів за симптомного та асимптомного перебігу стенозу сонних артерій залежно від його ступеня та структури атеросклеротичної бляшки.

**Результати.** Виявлене достовірне збільшення рівня Lp-PLA<sub>2</sub> у пацієнтів за симптомного стенозу внутрішньої сонної артерії (ВСА) та за його асимптомного перебігу за наявності м'якої атеросклеротичної бляшки. Концентрація гомоцистеїну не залежала від структури атеросклеротичної бляшки.

**Висновки.** При порівнянні вмісту гомоцистеїну та Lp-PLA<sub>2</sub> у пацієнтів при атеросклеротичному ураженні сонних артерій доведено, що вміст Lp-PLA<sub>2</sub> є більш інформативним діагностичним критерієм для виявлення пацієнтів з можливим виникненням гострого порушення кровообігу головного мозку. Підвищення рівня Lp-PLA<sub>2</sub> у пацієнтів при симптомному стенозі ВСА є свідченням нестабільності атеросклеротичної бляшки.

**Ключові слова:** атеросклероз сонних артерій; маркери запалення; нестабільна атеросклеротична бляшка; ішемічний інсульт; гомоцистеїн, Lp-PLA<sub>2</sub>.

### Abstract

**Objective.** To study the level of homocystein and lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) in patients, suffering atherosclerotic affection of carotid arteries, to estimate its connection with morphological changes of atherosclerotic plaque, the stenosis degree and severity of the disease symptoms.

**Materials and methods.** Changes of biomarkers in 130 patients, having symptomatic or asymptomatic course of the carotid arteries stenosis course, depending on its degree and structure of atherosclerotic plaque, were analyzed.

**Results.** Trustworthy increase of the Lp-PLA<sub>2</sub> level was noted in the patients, suffering symptomatic stenosis of internal carotid artery (ICA) and its asymptomatic course in presence of soft atherosclerotic plaque. Concentration of homocystein did not depend upon the atherosclerotic plaque structure.

**Conclusion.** While comparing of the homocystein and the Lp-PLA<sub>2</sub> content in patients, suffering atherosclerotic affection of carotid arteries, there was proved, that the Lp-PLA<sub>2</sub> content constitutes a more informative diagnostic criteria for revealing of patients with probable occurrence of an acute disorder of cerebral blood circulation. The Lp-PLA<sub>2</sub> level rising in patients with symptomatic ICA stenosis constitutes evidence for the atherosclerotic plaque instability presence.

**Keywords:** atherosclerosis of carotid arteries; markers of inflammation; unstable atherosclerotic plaque; ischemic insult; homocystein, Lp-PLA<sub>2</sub>.

В останні роки дослідники активно вивчають вплив запалення на патогенез атеросклерозу та нестабільність атеросклеротичної бляшки [1]. Багато уваги приділяють

пошуку маркерів запалення, за допомогою яких вдалося б виявити прогресування атеросклерозу та запобігти атеросклеротичним ускладненням [2]. Найбільш поши-

реними біомаркерами вважають Lp-PLA<sub>2</sub> та гомоцистеїн [3, 4].

В епідеміологічних дослідженнях переконливо доведено кореляцію між збільшенням концентрації Lp-PLA<sub>2</sub> і підвищеним ризиком виникнення серцево-судинних ускладнень [5]. Результати досліджень свідчать про наявність зв'язку між підвищенням рівня гомоцистеїну в плазмі крові та збільшенням площі ураження сонних і вінцевих артерій, аорти і периферійних судин [6]. Більшість авторів відзначали підвищення рівня обох маркерів у пацієнтів при виникненні атеросклеротичних ускладнень [2, 7]. Проте ми не знайшли досліджень, у яких би порівнювали вміст гомоцистеїну та Lp-PLA<sub>2</sub> та вивчали кореляцію цих біомаркерів залежно від перебігу атеросклерозу.

Мета дослідження – вивчення рівня гомоцистеїну та Lp-PLA<sub>2</sub> у пацієнтів при атеросклеротичному ураженні сонних артерій; оцінювання його зв'язку та кореляція залежно від структури атеросклеротичної бляшки, ступеня стенозу та вираженості симптомів захворювання.

### Матеріали і методи дослідження

Обстежені 130 пацієнтів, у яких виявлений атеросклеротичний стеноз сонних артерій, у тому числі чоловіків – 76 (58,5%), жінок – 54 (41,5%). Вік пацієнтів у середньому (62,5 ± 8,4) року. Критерієм включення пацієнтів у дослідження був верифікований за даними ультразвукового дослідження (УЗД) стеноз ВСА більше 50% – за симптомного та більше 70% – за асимптомного перебігу захворювання. Дуплексне сканування сонних артерій проведено з використанням лінійного датчика з частотою 8 МГц на апараті Philips HD 11 XE. Ступінь стенозу оцінювали за критеріями «Consensus Panel Gray-Scale and Doppler US Criteria for Diagnosis of ICA Stenosis» на підставі визначення систолічної та діастолічної швидкості кровотоку у ВСА. Крім стенозу ВСА, оцінювали структуру атеросклеротичної бляшки у В-режимі за допомогою gray scale median (GSM) (див. таблицю).

У 72 (55,4%) пацієнтів (I група) виявлений симптомний перебіг стенозу ВСА, у 58 (44,6%) пацієнтів (II група) – асимптомний. За віком і статтю групи хворих зіставні.

У дослідження не включали пацієнтів з ознаками запального процесу будь-якої локалізації, онкологічними захворюваннями, супутніми захворюваннями за несприятливого життєвого прогнозу та з тяжким неврологічним дефіцитом (геміплегія, кома).

Для порівняння результатів дослідження сформовано контрольну групу з 20 практично здорових осіб, зі сприятливим щодо атеросклерозу сімейним анамнезом, без факторів ризику (куріння, цукровий діабет, метаболічний синдром). В усіх пацієнтів контрольної групи визначали товщину комплексу «інтіма-медіа» (KIM) у лівій і

правій загальних сонних артеріях (ЗСА) на відстані 1 см від біфуркації за даними доплерографії у В-режимі.

Із супутніх захворювань у 89 (68,5%) пацієнтів виявлена ішемічна хвороба серця, діагноз верифікований на підставі аналізу даних анамнезу, ЕКГ, ЕхоКГ, велоергометрії. Відомості про інфаркт міокарда в анамнезі були у 25 (19,2%) пацієнтів, гіпертонічну хворобу – у 112 (86,2%), цукровий діабет – у 27 (20,8%).

Лабораторні дослідження проведені в ТОВ «Гемо Медика Україна» (Ужгород). Із судинних маркерів оцінювали вміст Lp-PLA<sub>2</sub> та гомоцистеїну.

В усіх пацієнтів натщесерце забирали 10 мл крові для біохімічного дослідження. Пробірку з кров'ю центрифугували при 2500 об./хв протягом 10 хв. Сироватку заморожували до -80 °С до моменту проведення аналізу.

Для визначення концентрації Lp-PLA<sub>2</sub> використовували ELISA контейнер (Human lipoprotein associated phospholipase A2, Cusabio, США). Дослідження проводили на апараті Siemens Immulite Homocysteine 2000.

Результати дослідження та відношення між двома змінними оцінювали за даними описової статистики з використанням статистичного тесту ANOVA one way test (MINITAB Inc. verzia 11.24, Coventry, United Kingdom) за стандартними методиками.

### Результати

При оцінюванні структури атеросклеротичної бляшки у I групі м'яка та змішана атеросклеротична бляшка виявлена у 66,7% хворих, у II групі – у 59,8%.

Рівень гомоцистеїну в сироватці крові був у межах від 6,4 до 24,4 мкмоль/л, у середньому 12,7 мкмоль/л, що на 57% перевищувало такий у контрольній групі – (7,8 ± 0,61) мкмоль/л. У 73,4% хворих концентрація гомоцистеїну перевищувала 10,5 мкмоль/л (цю величину вважають граничним рівнем, його перевищення є незалежним фактором ризику тромбоваскулярної хвороби).

Рівень Lp-PLA<sub>2</sub> понад 250 мкг/л виявлений у 66,7% хворих. Спостерігали достовірне підвищення рівня Lp-PLA<sub>2</sub> (p < 0,001) у пацієнтів за симптомного перебігу стенозу ВСА. Крім того, встановлена статистично значуща відмінність концентрації Lp-PLA<sub>2</sub> у пацієнтів II групи за наявності м'якої та змішаної атеросклеротичної бляшки порівняно з такою за твердої атеросклеротичної бляшки.

У 35% хворих II групи за наявності м'якої атеросклеротичної бляшки рівень Lp-PLA<sub>2</sub> був вищий, ніж у пацієнтів I групи за наявності твердої атеросклеротичної бляшки.

Встановлені статистично значущі відмінності концентрації гомоцистеїну в пацієнтів за симптоматичного та асимптомного перебігу стенозу ВСА. На відміну від Lp-PLA<sub>2</sub>, концентрація гомоцистеїну не залежала від

Характеристика пацієнтів залежно від ступеня стенозу та етогенності атеросклеротичної бляшки													
Ступінь стенозу, %	Кількість спостережень в групах залежно від структури атеросклеротичної бляшки												
	I (n=72)						II (n=58)						
	м'яка		змішана		тверда		м'яка		змішана		тверда		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
50 - 60	6	8,3	8	11,1	5	6,9	-	-	-	-	-	-	
60 - 80	4	5,6	10	13,9	12	16,7	9	11,5	8	13,8	6	10,3	
80 - 99	9	12,5	11	15,3	7	9,7	7	12,1	13	22,4	15	25,9	

структури атеросклеротичної бляшки. Крім того, виявлене підвищення вмісту гомоцистеїну у пацієнтів II групи у міру збільшення ступеня стенозу, тоді як вміст Lp-PLA<sub>2</sub> достовірно не змінювався.

Товщина КІМ ЗСА в контрольній групі становила від 1,3 до 1,8 мм, у середньому (1,45 ± 0,06) мм, що перевищувало порогове значення – 1 мм. Спостерігали збільшення концентрації гомоцистеїну в пацієнтів контрольної групи за умови збільшення товщини КІМ ЗСА; при цьому рівень Lp-PLA<sub>2</sub> не збільшувався.

### Обговорення

Актуальність вивчення судинних маркерів для діагностики ризику виникнення серцево-судинних ускладнень зумовлена високою частотою васкулярних захворювань та незадовільними результатами їх профілактики [3, 8]. Використовують різні васкулярні біомаркери, проте кожен з них має свою специфічність, а зміни його концентрації залежать від багатьох чинників [2, 9]. Більш ніж у 20 епідеміологічних дослідженнях продемонстровано вищу частоту атеросклеротичного ураження судин головного мозку, серця і нижніх кінцівок при гіпергомоцистеїнемії [4]. У дослідженні European Collaborative Study доведено, що гіпергомоцистеїнемія є незалежним фактором ризику виникнення серцево-судинних захворювань [7]. За даними обстеження 5665 мешканців Великої Британії середнього віку отримані докази взаємозв'язку підвищення рівня гомоцистеїну та виникнення мозкового інсульту. За тривалого (протягом 12,8 року) спостереження встановлено, що рівень гомоцистеїну вище в групі з 141 хворого, у яких виник інсульт, ніж у групі контролю пацієнтів того самого віку [9]. Таку тенденцію спостерігали і в нашому дослідженні в пацієнтів, які перенесли інсульт. У 1041 чоловіків і жінок літнього віку за даними Framingham Heart Study показано, що ризик виникнення стенозу сонної артерії підвищувався залежно від рівня гомоцистеїну. Після виключення впливу інших чинників, у пацієнтів за рівня гомоцистеїну 14 мкмоль/л ризик звуження просвіту артерії на 25% і більше був удвічі вищим, ніж за вмісту гомоцистеїну 9 мкмоль/л і менше [4]. Динаміка кореляції частоти стенозу та рівня гомоцистеїну важлива в пацієнтів за асимптомного перебігу стенозу ВСА. Незважаючи на малу кількість хворих, ми також відзначили взаємозв'язок між підвищенням рівня гомоцистеїну та збільшенням ступеня стенозу, тоді як вміст Lp-PLA<sub>2</sub> достовірно не змінювався.

У контрольній групі, при збільшенні товщини КІМ ЗСА спостерігали підвищення рівня гомоцистеїну, тоді як рівень Lp-PLA<sub>2</sub> не змінювався.

На підставі аналізу власних спостережень, ми можемо припустити, що залежність концентрації гомоцистеїну від ступеня стенозу та його збільшення при збільшенні товщини КІМ ЗСА може свідчити про діагностичну цінність гомоцистеїну як маркера прогресування атеросклерозу.

Щодо діагностичної цінності Lp-PLA<sub>2</sub>, то, за даними літератури, вона безпосередньо бере участь у патогенезі прогресування атеросклеротичних бляшок [3].

Відмінністю стабільної та нестабільної атеросклеротичної бляшки може бути наявність активованих запальних клітин і збільшення концентрації Lp-PLA<sub>2</sub> в нестабільній бляшці [10]. Отже, Lp-PLA<sub>2</sub> може бути фактором ризику, що має важливе значення не тільки для формування атеросклеротичної бляшки, а й її розриву. Це припущення достовірно підтвержене й у нашому дослідженні, встановлено статистичну відмінність збільшення вмісту Lp-PLA<sub>2</sub> у пацієнтів II групи за наявності м'якої атеросклеротичної бляшки, тоді як концентрація гомоцистеїну достовірно не змінювалася залежно від структури атеросклеротичної бляшки.

### Висновки

1. Lp-PLA<sub>2</sub> є більш інформативним діагностичним критерієм для виявлення пацієнтів, у яких можливе виникнення атеросклеротичних ускладнень.

2. Підвищення рівня Lp-PLA<sub>2</sub> у пацієнтів за асимптомного стенозу ВСА є свідченням нестабільності атеросклеротичної бляшки.

3. Гомоцистеїн – більш достовірний діагностичний маркер для виявлення прогресування атеросклерозу.

### References

1. Rusyn VI, Korsak VV, Butsko YeS, Levytskyi AV, Borsenko MI. Syndrom obkradannia pry patolohii sudyn duhy aorty. Uzhhorod: Karpaty; 2011. 208 s. [In Ukrainian].
2. Bhatti S, Hakeem A, Cilingiroglu M. Lp-PLA(2) as a marker of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep.* 2010 Mar;12(2):140–4. doi: 10.1007/s11883-010-0095-6.
3. Sertić J, Skorić B, Lovrić J, Bozina T, Reiner Z. Does Lp-PLA2 determination help predict atherosclerosis and cardiocerebrovascular disease? *Acta Med Croatica.* 2010 Oct;64(4):237–45.
4. Sobczyńska-Malefora A, Cutler J, Rahman Y. Elevated homocysteine with pseudo-homozygosity for MTHFR677T as predisposing factors for transient ischemic attacks: a case report. *Metab Brain Dis.* 2016 Oct;31(5):1205–8. doi: 10.1007/s11011-016-9875-1. Epub 2016 Jul 18.
5. Gonçalves I, Edsfieldt A, Ko NY, Grufman H, Berg K, Björkbacka H, et al. Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Jun;32(6):1505–12. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.249854. Epub 2012 Apr 12.
6. Torma N, Kopolovets II, Sihotsky V, Kubikova M, Frankovicova M. Surgical treatment of atherosclerotic stenosis of carotid arteries in combination with pathological tortuosity of the internal carotid artery for ischemic stroke prevention. *Novosti khirurgii.* 2015 Nov–Dec; Vol 23 (6): 631–6. doi: 10.18484/2305-0047.2015.6.631. [In Russian].
7. Kawada T. Regarding Subclinical carotid artery disease and plasma homocysteine levels in patients with hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2015 May;9(5):410–1. doi: 10.1016/j.jash.2015.03.001. Epub 2015 Mar 6.
8. Sihotský V. Metodou prvej voľby pri stenóze karotid je CEA. *Cesk Slov Ne urol N.* 2016;79/ 112(4): 397–9. [In Slovakian].
9. Catena C, Colussi G, Url-Michitsch M, Nait F, Sechi LA. Subclinical carotid artery disease and plasma homocysteine levels in patients with hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2015 Mar;9(3):167–75. doi: 10.1016/j.jash.2014.12.020. Epub 2015 Jan 6.
10. Johnson JL, Shi Y, Snipes R, Janmohamed S, Rolfe TE, Davis B, et al. Effect of darapladib treatment on endarterectomy carotid plaque lipoprotein-associated phospholipase A2 activity: a randomized, controlled trial. *PLoS One.* 2014 Feb 20;9(2):e89034. doi: 10.1371/journal.pone.0089034. eCollection 2014.