

Федеральное агентство научных организаций  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук»



**Научно-исследовательский институт кардиологии**

Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Торим Ю.Ю., Пушникова Е.Ю., Аптекарь В.Д.,  
Сваровская А.В.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
по новой медицинской технологии**

**«Способ прогнозирования течения хронической сердечной  
недостаточности у больных ишемической болезнью сердца по  
содержанию в крови одного из провоспалительных цитокинов -  
растворимого FAS-лиганда»**

Томск 2017

# 1. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

## 1.1 Аннотация

Цель разработанной медицинской технологии «Способ прогнозирования течения хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца по содержанию в крови одного из провоспалительных цитокинов - растворимого Fas-лиганда» - разработка объективного неинвазивного высокоинформативного способа прогнозирования течения хронической сердечной недостаточности (ХСН) по содержанию в крови растворимого Fas-лиганда (sFas-L).

Объектом исследования являются пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС), ассоциированной с хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

В исследование включено 94 больных ИБС (57 мужчин и 37 женщин) в возрасте от 45 до 65 лет (средний возраст  $57,3 \pm 6,7$ ) с ХСН II-IV ФК. В группу контроля вошли 32 здоровых волонтера. В начале исследования и через 12 мес. наблюдения в сыворотке крови с помощью иммуноферментного метода определяли содержание апоптоз-опосредуемого фактора - растворимого Fas-лиганда. По итогам годичного наблюдения больные были рандомизированы на две группы: группа А (n=49) с благоприятным и группа В (n=45) - с неблагоприятным течением сердечно-сосудистой патологии.

Результаты. У больных ХСН в исходном состоянии уровень sFas-L существенно (в 3-6 раз,  $p < 0,001$ ) превышал таковой в контрольной группе. У мужчин с неблагоприятным течением ХСН исходно ( $85,94 \pm 4,14$  пг/мл) уровень sFas-L в сыворотке крови значительно превышал ( $p = 0,0015$ ) по своему значению таковой в группе с благоприятным течением ( $107,33 \pm 5,13$  пг/мл). ROC-анализ показателей чувствительности и специфичности стратификации риска развития неблагоприятного сердечно-сосудистого события по значениям sFas-L выявил высокую прогностическую значимость данного маркера – ROC-Area  $\pm$  S.E. составила  $0,75 \pm 0,05$  (95%ДИ=0,60-0,81,  $p = 0,0005$ ). Установлена статистически значимая умеренная отрицательная корреляционная связь фракции выброса левого желудочка (ЛЖ) с концентрацией sFas-L, а также умеренная прямая корреляционная зависимость между концентрацией sFas-L в сыворотке и параметрами ремоделирования ЛЖ.

Выводы. sFas-L детерминирует развитие ишемического ремоделирования ЛЖ и тяжесть течения ХСН, его уровень в крови возрастает пропорционально степени прогрессирования заболевания. Определение уровня sFas-L в сыворотке крови обеспечивает объективную оценку тяжести ХСН и является важным прогностическим тестом для прогнозирования течения ХСН у больных ИБС.

Масштаб новизны технологии (2 - новая технология для отрасли в стране)

Уровень новизны технологии (2- улучшающая)

Метод оказания медицинской помощи (2 - неинвазивный)

## Информация о внедрении медицинской технологии

Информация о внедрении медицинской технологии	Внедрена в лечебно-диагностический процесс клиники НИИ кардиологии Томского НИМЦ (акт внедрения № 7 от 12.10.2017)
---	--

## 1.2 Введение

ИБС представляет собой наибольшую социально значимую проблему среди всех сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и ассоциируется с манифестацией и неуклонным прогрессированием ХСН. Феномен ишемического ремоделирования миокарда рассматривается как сложный многоступенчатый процесс изменения структурно-геометрических характеристик ЛЖ, проявляющийся в виде гипертрофии и дилатации камер сердца, приводящий к развитию систолической и диастолической дисфункции, ухудшающий качество жизни и выживаемость пациентов. Различными группами ученых сформулированы предпосылки к созданию гипотезы развития ХСН, в основе которой лежит апоптоз кардиомиоцитов. Процесс ремоделирования миокарда предшествует и в последствие сопровождает клиническую манифестацию ХСН. В основе процесса ишемического ремоделирования миокарда лежат три ключевых механизма: фиброз, гипертрофия и гибель кардиомиоцитов, которая осуществляется двумя процессами: некрозом и апоптозом. Существующие представления о роли нарушения регуляции программированной гибели кардиомиоцитов в патогенезе ХСН весьма противоречивы. Длительное время считалось, что апоптоз не характерен для высокодифференцированных тканей. Однако при ХСН наблюдается снижение сократительной способности ЛЖ, и зачастую этот процесс протекает без признаков ишемии миокарда. Ранее S. Gang была выявлена взаимосвязь повышенного уровня проапоптотического лиганда (Fas-L) в плазме крови с повышением соответствующих рецепторов (Fas-R) на мембране кардиомиоцитов, что объясняет развитие ХСН при хронической ишемии миокарда.

Fas-лиганд является одним из внешних факторов, запускающих в клетке апоптоз. E. Rouvier установлено, что сублиния цитотоксической Т-клеточной гибридомы PC60 d10S, межклеточного гибрида между мышинной линией цитотоксических лимфоцитов и лимфомой крысы, способна убивать клетки-мишени, экспрессирующие Fas-белок. Химерный белок Fas Fe (Fe - фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулинов) ингибировал цитолитическую активность клеток этой сублинии, что дало возможность предположить, что она обусловлена Fas-L. Fas-L выделен из мембранной фракции клеток сублинии PC60-d10S. Позднее, T. Suda установлено, что белок обладает мощной цитотоксичностью в отношении Fas позитивных клеток. В последствие S. Nagata показано, что это интегральный белок мембраны, который проникая во внеклеточную среду и действует как растворимый цитокин, и связываясь с рецептором, запускает цепь передачи сигнала, приводящего к апоптозу. Установлено, что активация молекулярных механизмов программируемой гибели клеток у больных миокардитом с симптомами сердечной недостаточности ассоциировалась с повышением Fas-L. Рост экспрессии рецепторов Fas/Apo-1 у больных ХСН сопровождается повышением индекса апоптоза, а концентрация проапоптотических лигандов (в том числе Fas-1) и в сыворотке крови и увеличением числа рецепторов на поверхности кардиомиоцитов.. M.A. Furtuno (2003) показал, что нарушение белкового баланса и активация эффекторных апоптотических механизмов в кардиомиоцитах во многом определяет вариант ремоделирования миокарда и влияет на скорость прогрессирования ХСН.

Пути регуляции программированной гибели кардиомиоцитов в патогенезе развития и прогрессирования ХСН у больных с ишемической кардиопатией изучены

недостаточно. Из единичных исследований известно, что оценка содержания белка апоптоз-опосредуемого фактора - sFas-L может рассматриваться в качестве предиктора стратификации риска развития ишемического ремоделирования ЛЖ и апоптоза миокарда, приводящих к неблагоприятному течению ХСН. В этой связи для оптимизации патогенетического лечения и профилактики ишемической дисфункции сердца, лежащей в основе манифестации сердечной недостаточности, представляется настоятельно необходимой разработка новых, более эффективных медицинских технологий, направленных на персонафицированную диагностику манифестации и прогрессирования ХСН у больных ИБС.

### **1.3 Область применения**

Медицинская технология разработана для кардиологической и терапевтической практики и будет использоваться в поликлиниках, кардиологических диспансерах, кардиологических стационарах, стационарах сердечно-сосудистой хирургии у больных ИБС, ассоциированной с ХСН. Это обеспечит снижение частоты повторных госпитализаций по поводу прогрессирования ХСН и летальности из-за сердечно-сосудистых причин в практическом здравоохранении, а в конечном итоге, позволит снизить затраты государства на лечение и профилактику социально значимой патологии.

### **1.4 Нормативные ссылки**

В настоящем документе использованы ссылки на нормативные документы:

- Правила подготовки нормативных правовых актов федеральных органов исполнительной власти и их государственной регистрации (в ред. Постановлений Правительства РФ от 13.08.1997 г. № 1009, с изменениями от 11.12.1997 г. № 1538, 06.11.1998 г. № 1304, от 11.02.1999 г. № 154, от 30.09.2002 г. № 715, от 07.07.2006 г. № 418, от 29.12.2008 г. № 1048, от 17.03.2009 г. № 242, от 20.02.2010 г. № 336).
- Постановление Правительства Российской Федерации от 15 июня 2009 г. № 477 «Об утверждении Правил делопроизводства в федеральных органах исполнительной власти».
- ГОСТ Р 1.4-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения».
- ГОСТ Р 1.5-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты национальные Российской Федерации. Правила построения, изложения, оформления и обозначения».
- ГОСТ Р 1.1.003-96 «Общие требования к построению, изложению и оформлению нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования. Руководство».
- ГОСТ Р 8.563-96 «Государственная система стандартизации Российской Федерации. Порядок разработки государственных стандартов».
- ГОСТ Р 8.010-99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения».

### **1.5 Определения, обозначения, сокращения, ключевые слова**

ДИ - доверительный интервал

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМ - инфаркт миокарда  
ЛЖ - левый желудочек  
ОА - определяемый агент  
СМА - специфические моноклональные антитела  
ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания  
ФВ ЛЖ - фракция выброса левого желудочка  
ФК - функциональный класс  
ХСН - хроническая сердечная недостаточность  
ШОКС - шкала оценки клинического состояния  
ЭКГ - электрокардиография  
ЭхоКГ - эхокардиография  
sFas-L - растворимый Fas-лиганд

## **1.6 Показания и противопоказания к использованию метода**

1.6.1 Показания: наличие ИБС, отягощенной ХСН.

1.6.2 Противопоказания:

Абсолютные противопоказания: нет.

Относительные противопоказания: нет.

## **1.7 Методика проведения медицинской технологии «Способ прогнозирования течения хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца по содержанию в крови одного из провоспалительных цитокинов - растворимого FAS-лиганда»**

При обращении у пациента с ИБС забирается кровь для определения сыворотке содержания апоптоз-опосредуемого фактора - растворимого Fas-лиганда с помощью иммуноферментного метода.

1.7.1 Последовательность осуществления медицинской технологии

Определение уровня sFas-L в сыворотке крови проводится методом иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA).

Используемый материал: сыворотка крови.

Приготовление образцов: перед исследованием 1 часть сыворотки разводится в 30 раз трис-буфером.

Ход определения:

- 1) Подготовка микротитрационных стрипов.
- 2) Добавление разведенного буфером материала в лунку микротитрационного стрипа и инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре.
- 3) Промывание.
- 4) Добавление в лунку микротитрационного стрипа иммуноконъюгатов и инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре.
- 5) Промывание.
- 6) Добавление раствора субстрата о-фенилдиамина/ $H_2O_2$ .
- 7) Ровно через 3 мин добавление соляной кислоты (1 моль/л).
- 8) Чтение результатов на ИФА-анализаторе через 10-120 мин.

Специфические моноклональные антитела (СМА) к определяемому агенту (ОА) в избытке фиксированы на внутренней стенке ячейки микротитрационного планшета. В первой иммунореакции свободный плазменный антиген ОА взаимодействует и образует комплекс с пристеночными моноклональными антителами. Затем

присутствующие в тест-системе компоненты плазмы удаляются промыванием на промывателе микротитрационных микропланшет. Поскольку антиген имеет постоянную антигенную детерминанту, то добавление (в избытке) меченых пероксидазой антител к ОА, приводит к формированию сэндвич-комплексов (вторая иммунореакция), в которых антиген ОА закрыт антителами с обеих сторон. Число меченых пероксидазой антител пропорционально количеству ОА, содержащемуся в исследуемом материале. Индикаторная реакция (детекция) запускается добавлением субстрата - о-фенил-диамина/ $H_2O_2$ , который расщепляется пероксидазой фиксированного на внутренней стенке комплекса антитело-антиген-антитело, с выделением хромогена (красящего вещества), определяемого фотометрически (на иммуноферментном фотометре с длиной волны 492 нм).

При выявлении у пациентов с ИБС уровня растворимого Fas-лиганда более 99,9 пг/мл прогнозируют неблагоприятное течение заболевания.

ROC-анализ показателей чувствительности и специфичности прогнозирования развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий по значениям sFas-L выявил достаточно высокую прогностическую значимость данного маркера: ROC-Area $\pm$ S.E. составила  $0,75\pm 0,05$  (95% ДИ= $0,60-0,81$ ,  $p=0,0005$ ). Уровень sFas-L более 99,9 пг/мл позволил с наибольшей вероятностью (чувствительность – 71%, специфичность – 65%) прогнозировать неблагоприятные сердечно-сосудистые события у больных ХСН (рис. 1).

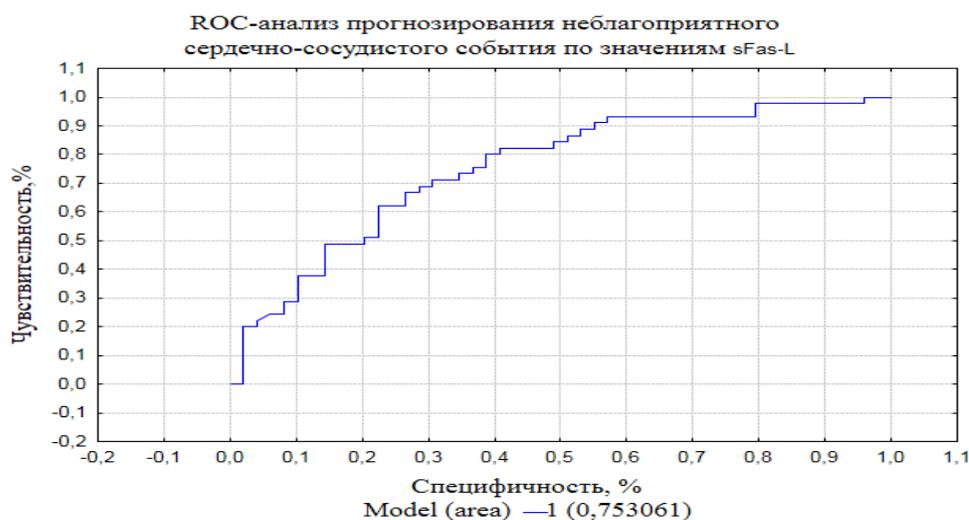


Рис. 1. ROC-кривая чувствительности и специфичности значений sFas-L в неблагоприятном прогнозе течения ХСН

Предсказательная ценность данного способа неблагоприятного прогноза течения ХСН по определению в сыворотке крови растворимого Fas-лиганда убедительно продемонстрировала преимущества биохимического определения растворимого Fas-лиганда перед «традиционной» ультразвуковой диагностикой (ЭхоКГ) ХСН (рис. 2). Площадь под кривой (ROC-Area $\pm$ S.E.) для растворимого Fas-лиганда составила  $0,71\pm 0,05$  (95% ДИ= $0,60-0,81$ ,  $p=0,0005$ ), превысив таковой показатель для ФВ ЛЖ - ROC-Area $\pm$ S.E= $0,63\pm 0,06$  (95% ДИ= $0,52-0,74$ ,  $p=0,0325$ ).

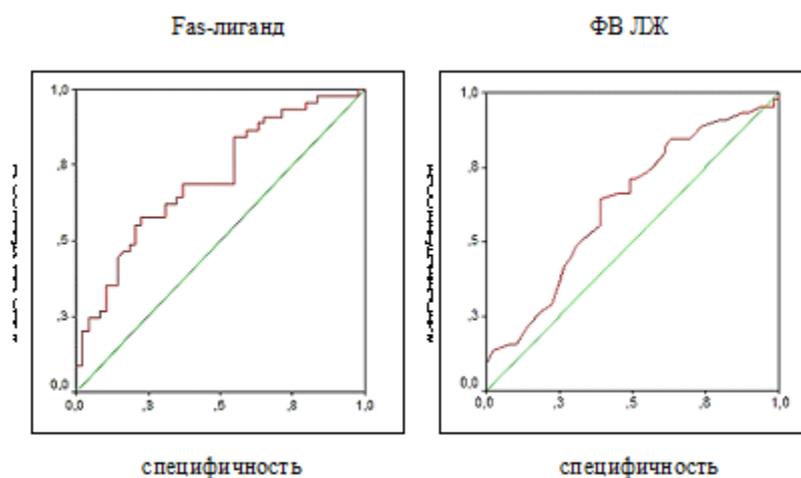


Рис. 2. Предсказательная ценность данного способа неблагоприятного прогноза течения ХСН по уровню Fas-лиганда и ФВ ЛЖ (ЭхоКГ)

1.7.2 Материально-техническое обеспечение новой медицинской технологии предполагает использование следующего оборудования и расходного материала:

Оборудование: иммуноферментный анализатор.

Расходный материал: набор фирмы Bender MedSystems (Австрия).

Список используемых лекарственных препаратов: стандартная комбинированная терапия, соответствующая национальным и европейским рекомендациям по лечению ИБС и ХСН (2013), включающая ингибиторы АПФ или антагонисты рецепторов к ангиотензину II,  $\beta$ -адреноблокаторы, диуретики, дезагреганты, статины при необходимости антагонисты альдостерона, сердечные гликозиды в индивидуально подобранных дозах.

## 1.8 Осложнения и способы их устранения

Осложнений не зарегистрировано.

## 1.9 Заключение

Установлено, что неблагоприятное течение ХСН у пациентов с ИБС, обусловленное апоптозом кардиомиоцитов и ремоделированием миокарда с явными нарушениями инотропной функции сердца, сопровождается повышенным (более 99,9 пг/мл) уровнем растворимого Fas-лиганда и имеет прогностическое значение.

Внедрение технологии не требует использования сложного дорогостоящего оборудования, она проста в исполнении.

Внедрение и использование новой медицинской технологии «Способ прогнозирования течения хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца по содержанию в крови одного из провоспалительных цитокинов - растворимого FAS-лиганда»:

1. Оценить персональный риск прогрессирования ХСН у больных ИБС еще на ранней стадии манифестации заболевания, назначить соответствующую патогенетическую профилактическую терапию, направленную на ингибирование процессов ишемического ремоделирования ЛЖ и апоптоза миокарда.
2. Повысить предсказательную ценность неблагоприятного прогноза течения ХСН.

3. Определить приоритетную группу больных ИБС для диспансерного наблюдения и оптимизации эффективных целевых профилактических мероприятий, направленных на профилактику развития ХСН и предотвращение у них исключительно высокой преждевременной смертности, что, в конечном итоге, позволит снизить затраты государства на лечение и профилактику социально значимой патологии.

## 1.10 Библиография

Библиографические данные методических рекомендаций по применению новой медицинской технологии, научных публикаций, связанных с разработкой данной медицинской технологии (при наличии)	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Способ прогнозирования течения хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца [Текст]: пат. 2599501 Рос. Федерация МПК G01N 33/53. /Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Шилов Е.Н., Ефремов А.В.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии». - № 2014110099; заявл. 06.03.2014; опубл. 10.10.2016, Бюл. № 28.</li><li>2. Тепляков А.Т., Березикова Е.Н., Шилов С.Н., Гракова Е.В., Торим Ю.Ю., Ефремов А.В., Попова А.А., Пустоветова М.Г., Сабирова А.Ю., Копьева К.В. Роль растворимого Fas-лиганда в ремоделировании миокарда, тяжести течения и исходах хронической сердечной недостаточности // Тер. архив. – 2016. – № 9. – С. 10-16.</li><li>3. Калюжин В.В., Тепляков А.Т., Соловцов М.А., Калюжина Е.В., Беспалова И.Д., Терентьева Н.Н. Ремоделирование левого желудочка: один или несколько сценариев? // Бюл. сиб. мед. – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 120-139.</li><li>4. Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Шилов С.Н., Копьева К.В., Калюжин В.В. Ранние маркеры прогрессирования сердечной недостаточности и апоптоза: роль в прогнозировании риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных, перенесших инфаркт миокарда // Бюл. сиб. мед. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 37-46.</li></ol>
--	--

## 2. ТРЕБОВАНИЯ К МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ, В КОТОРОЙ БУДЕТ ОСУЩЕСТВЛЯТЬСЯ ВНЕДРЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Наличие лицензии на осуществление медицинской деятельности с указанием перечня работ (услуг), составляющих медицинскую деятельность, для оказания первичной специализированной медико-санитарной помощи; специализированной медицинской помощи; высокотехнологичной медицинской помощи в стационарных условиях и в условиях дневного стационара. Должна включать в себя профилактику, диагностику и лечение ХСН у больных ИБС.

## 3. ТРЕБОВАНИЕ К КАДРОВОМУ СОСТАВУ

Медицинская технология разработана для кардиологической и терапевтической практики (для врачей терапевтов, кардиологов, врачей-лаборантов) и будет использоваться в поликлиниках, кардиологических диспансерах, кардиологических стационарах, стационарах сердечно-сосудистой хирургии.

#### **4. ТРЕБОВАНИЯ К ОСНАЩЕНИЮ И ИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ УСПЕШНОГО ВНЕДРЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ЗА ПРЕДЕЛАМИ ОРГАНИЗАЦИИ-РАЗРАБОТЧИКА ТЕХНОЛОГИИ**

Необходим иммуноферментный анализатор, набор для определения sFas-L в сыворотке крови.