

Е. В. Баранова, А. В. Абрамов, В. И. Дарий

## Сравнительная характеристика методов определения маркера воспаления матриксной металлопротеиназы-9

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** инсульт, матриксная металлопротеиназа-9.

С целью модификации стандартной методики определения матриксной металлопротеиназы-9 для раннего прогнозирования геморрагических осложнений мозгового ишемического инсульта обследовали 88 больных. Концентрацию матриксной металлопротеиназы-9 в сыворотке крови определяли по стандартной методике, заявленной в инструкции, прилагаемой к набору реагентов, и по модифицированной методике (увеличение температуры инкубации до 37–38°C (при постоянном встряхивании) и сокращение времени каждой инкубации вдвое). Установлено, что модифицированная методика определения матриксной металлопротеиназы-9 может использоваться в прогнозировании возникновения вторичных геморрагических осложнений, а также для определения целесообразности и безопасности применения тромболитической терапии. Если концентрация матриксной металлопротеиназы-9 по модифицированной методике определения ниже 39,7 нг/мл, процент вторичных геморрагических осложнений будет минимален. Сокращение времени проведения анализа расширяет границы использования тромболитической терапии во время кратковременного терапевтического окна в острой стадии ишемического инфаркта.

### Порівняльна характеристика методів визначення маркера запалення матриксної металопротеїнази-9

К. В. Баранова, А. В. Абрамов, В. І. Дарій

З метою модифікації стандартної методики визначення матриксної металопротеїнази-9 для раннього прогнозування геморагічних ускладнень мозкового ішемічного інсульту обстежили 88 хворих. Концентрацію матриксної металопротеїнази-9 у сироватці крові визначали за стандартною методикою, що заявлена в наданій до набору реагентів інструкції, і за модифікованою методикою (підвищення температури інкубації до 37–39°C (при постійному струшуванні) і скорочення часу кожної інкубації вдвічі). Виявили, що модифіковану методику визначення матриксної металопротеїнази-9 можна використовувати в прогнозуванні виникнення вторинних геморагічних ускладнень, а також для виявлення доцільності та безпечності застосування тромболітичної терапії. Коли концентрація матриксної металопротеїнази-9 за модифікованою методикою визначення менша ніж 39,7 нг/мл, та відсоток вторинних геморагічних ускладнень буде мінімальним. Скорочення часу здійснення аналізу розширює межі використання тромболітичної терапії під час короткочасного терапевтичного вікна в гострій стадії ішемічного інфаркту.

**Ключові слова:** інсульт, матриксна металопротеїназа-9.**Патологія.** – 2014. – №3 (32). – С. 111–114

### Comparative characteristic of methods for determining the inflammation marker matrix metalloproteinase-9

E. V. Baranova, A. V. Abramov, V. I. Dariy

**Aim.** We examined 88 patients with stroke, for whom the determination of the concentration of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in serum was carried out by standard methods declared in instructions supplied with the reagents kit, and by the modified methods.

**Results.** It was determined that the modified methods of determining the MMP-9 can be used in predicting the occurrence of secondary hemorrhagic complications and to determine the feasibility and safety of thrombolytic therapy.

**Conclusion.** If the concentration of MMP-9 by the modified methods of determining is below 39,7 ng/ml, the percentage of secondary hemorrhagic complications is minimal.

**Key words:** Stroke, Matrix Metalloproteinase-9.**Pathologia.** 2014; №3 (32): 111–114

Сегодня на долю сосудистой патологии приходится самая высокая заболеваемость, что обуславливает прогрессирующее повышение инвалидизации и летальности среди населения различных возрастных групп [1,4,10]. Мозговой инсульт в большинстве случаев является конечной точкой прогрессирования разных видов сердечно-сосудистой патологии [2,3].

Один из наиболее эффективных методов лечения мозговых инсультов – тромболитическая терапия, направленная на восстановление сосудистого русла. Однако эффективность реперфузионной терапии напрямую зависит от длительности терапевтического окна: чем раньше больному введут тромболитические препараты, тем лучше будет эффект. В то же время не исключены осложнения, вызванные применением тромболитических препаратов – вторичные гемorragии [5].

Существует ряд биологических маркеров, определение которых повышает точность прогноза возникновения неблагоприятных клинических исходов и таких осложнений, как геморрагическая трансформация при ишемическом инсульте [11,12]. Матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9) – один из основных маркеров, предикторов геморрагических трансформаций при всех патогенетических вариантах инсульта [7].

Количественное определение содержания ММП-9 в сыворотке крови возможно с применением метода твердофазного иммуноферментного анализа, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью. Одной из ведущих фирм-производителей тест-систем для определения этого маркера является компания Bender Medsystems (Австрия). Учитывая, что длительность исследования согласно инструкции, прилагаемой к

тест-системе, составляет не менее 4 часов, промежуток, отведенный на транспортировку больного в лечебное учреждение и проведение компьютерной томографии, занимает много времени, а рекомендуемое терапевтическое окно для внутривенного введения рекомбинантного тканевого активатора плазминогена составляет первые 4,5 часа от начала ишемического инсульта [8,9] (способствуют лучшему функциональному исходу заболевания [6]), возникает необходимость поиска возможности сокращения времени проведения анализа. Так как своевременность определения уровня ММП-9 имеет большое значение для корректировки схемы проводимой терапии, появляется необходимость значительного сокращения продолжительности анализа при использовании этой тест-системы.

### Цель работы

Модификация стандартной методики определения ММП-9 для раннего прогнозирования геморрагических осложнений мозгового ишемического инсульта.

### Пациенты и методы исследования

Под наблюдением находили 88 больных мозговым инсультом: 65 пациентов с ишемическим инсультом, 4 – с геморрагическим инсультом, у 19 больных диагностирован ишемический инсульт с геморрагической трансформацией; 15 пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией составили группу сравнения. Среди больных 55 (62,5%) мужчин и 33 (37,5%) женщины; средний возраст – 63±1,06 года.

Больным проведено комплексное неврологическое, инструментальное (ультразвуковая доплерография сосудов головы и шеи, компьютерная томография головного мозга с вычислением объема очага поражения по формуле эллипсоида ( $V = 0,52 \times A \times B \times C$ )) и лабораторное обследования. Количественное определение ММП-9 осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы Bender Medsystems (Австрия). Реагенты для анализа готовили согласно инструкции фирмы-производителя тест-системы. Образцы сыворотки 16 пациентов исследованы как по стандартной методике, заявленной в прилагаемой к набору реагентов инструкции, так и по модифицированной.

**Процедура анализа.** Непосредственно перед началом анализа микропланшет промывали солевым буферным раствором. Далее в соответствующие микрополоски вносили аликвоту (100 мкл) стандартных растворов ММП-9 и образцов сыворотки, разбавленных рабочим буфером (1:10). Первую инкубацию осуществляли на шейкере в течение 2 часов при комнатной температуре +18–20°C после внесения в каждую лунку по 50 мкл биотинового конъюгата. Вторую инкубацию проводили в течение 1 часа при температуре +18–20°C с добавлением в каждую лунку по 100 мкл раствора стрептавидина – пероксидазы. Модификация метода заключалась в увеличении температуры инкубации до 37–38°C (при постоянном встряхивании) и сокращении времени каждой инкубации вдвое (на 1 час первой инкубации и

на 30 минут второй инкубации). Последующие этапы не модифицировали. Абсорбцию образцов измеряли на иммуноферментном анализаторе SirioS (Италия) при длине волны 450 нм против 620 нм. Результаты (в нг/мл) осуществляли автоматически с помощью соответствующего программного обеспечения и согласно калибровочной кривой. Во внимание также принимали коэффициент разведения образцов.

Таким образом, продолжительность процедуры анализа сокращалась на 1,5 часа. Воспроизводимость результатов исследования проверяли параллельным определением содержания ММП-9 в одних и тех же образцах одновременно как по стандартной методике, так и по модифицированной.

Результаты исследования статистически обрабатывали при помощи статистического пакета Statistica 6.0. Различия между показателями считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Учитывая, что уровень ММП-9 в сыворотке крови меняется при сосудистых нарушениях, установили значения ММП-9, в большинстве случаев сопровождающиеся нарушениями неврологического статуса или другими клиническими проявлениями. В связи с этим проведен комплексный анализ лабораторных и инструментальных исследований, установлено, что у большинства пациентов с мозговыми инсультами при проведении стандартной методики ММП-9 составляла более 50 нг/мл.

В результате анализа данных (табл. 1) отмечена закономерность: у 20 из 65 больных ишемическим инсультом (30,8%) и у 8 больных группы сравнения (53,3%) содержание ММП-9 в сыворотке крови было ниже 50 нг/мл. Особенно важным считаем факт, что ни у одного из 19 больных ишемическим инсультом с геморрагической трансформацией и из 4 больных геморрагическим инсультом показатель ММП-9 не был ниже 50 нг/мл.

Таблица 1  
Количественно-процентное соотношение больных, у которых концентрации ММП-9 ниже 50 нг/мл

Характер инсульта	ММП-9	
	N	%
Ишемический инсульт, n=65	20	30,8
Геморрагический инсульт, n=4	0	0
Ишемический инсульт с геморрагической трансформацией, n=19	0	0
Дисциркуляторная энцефалопатия (группа сравнения), n=15	8	53,3

*Примечание:* n – количество больных; N – количество больных, у которых концентрация ММП-9 ниже 50 нг/мл.

В таблице 2 представлены результаты, полученные по стандартной и модифицированной методикам определения ММП-9 у пациентов с мозговыми инсультами.

У 90% больных, сыворотку крови которых исследовали по сокращенной до 2 часов методике, отмечены практически однонаправленные изменения результатов,

а именно их уменьшение. Показатели варьировали от 0,4% до 47,2%, в среднем – 20,6%. В двух случаях результаты сокращенного по времени исследования были выше, чем полученные по стандартной методике, – на 17,8% и 39,6% соответственно.

Таблица 2

### Сравнительная характеристика методик определения матричной металлопротеиназы-9

Стандартная методика (длительность определения 3,5–4 часа), нг/мл, n=16	Модифицированная методика (длительность определения 2 часа) нг/мл, n=16	Разница показателей, %
80,2	44,4	-44,6
76,8	54,8	-28,6
39,4	29,4	-25,4
117,2	112,4	-4,1
101,4	74,8	-26,2
112,8	59,6	-47,2
96,4	113,6	17,8
130,4	72,4	-44,5
141,9	97,8	-31,1
84,1	57,2	-32,0
35,0	32,7	-6,6
138,7	94,4	-31,9
53,7	53,5	-0,4
125,5	79,3	-36,8
10,6	14,8	39,6
74,6	54,0	-27,6
Среднее: 88,67±9,81	Среднее: 65,32±7,25	Среднее: -20,6±6,00

Примечание: n – количество больных.

У всех 7 больных с геморрагическим компонентом инсульта (геморрагическим инсультом и ишемическим инсультом с геморрагической трансформацией), которые были набраны для сравнения двух методик, показатели ММП-9, определяемые по модифицированной методике, были выше 50 нг/мл, то есть не входили в интервал, вы-

численный нами для стандартной методики обследования. Показатель ММП-9 ниже 50 нг/мл, определяемый по модифицированной методике, отмечен у 4 больных с ишемическим поражением мозга (44,4%). Это дает право уже в двухчасовой период предполагать ишемический характер очага в дебюте заболевания или опасность геморрагических осложнений, а также оценить целесообразность проведения тромболитической терапии. Однако эти выводы требуют большего количественного подтверждения.

Учитывая, что у больных с концентрацией ММП-9 ниже 50 нг/мл отмечены только ишемические изменения (без геморрагических осложнений), а также принимая во внимание, что при сокращении времени методики (до 2 часов) практически во всех случаях установлены однонаправленные изменения в сторону уменьшения концентрации ММП-9 в среднем на 20,6%, есть основания полагать: если с применением модифицированного теста определения ММП-9 получено значение показателя до 39,7 нг/мл, то угроза вторичных кровоизлияний – минимальна. Сокращение времени проведения анализа расширяет границы использования тромболитической терапии во время кратковременного терапевтического окна в острой стадии ишемического инфаркта.

#### Выводы

Модифицированную методику определения ММП-9, сокращенную на 1,5 часа, можно использовать для наиболее раннего прогнозирования возникновения вторичных геморрагических осложнений, а также для определения целесообразности и безопасности применения тромболитической терапии.

В случае, если концентрация ММП-9 по модифицированной методике определения ниже 39,7 нг/мл, процент вторичных геморрагических осложнений будет минимальным как у больных без проведения тромболитической, так и у пациентов, которым проведен системный тромболитический.

#### Список литературы

1. Дзяк Л.А. Инсульт у молодых пациентов / Л.А. Дзяк, Е.С. Цуркаленко // Здоров'я України. – 2009. – №5/1. – С. 12–15.
2. Сучасні принципи діагностики та лікування хворих із гострими порушеннями мозкового кровообігу: методичні рекомендації / Ю.П. Зозуля, П.В. Волошин, Т.С. Міщенко, Л.А. Дзяк та ін. – К., 2005. – 66 с.
3. Суслина З.А. Сосудистые заболевания головного мозга / З.А. Суслина, Ю.А. Варакин, Н.В. Верещагин // Эпидемиология. Основы профилактики. – М.: Медпресс-информ, 2006. – 256 с.
4. Особенности эпидемиологии инвалидности при заболеваниях нервной системы в Украине / Н.К. Хобзей, В.А. Голик, Н.А. Гондуленко, Т.С. Мищенко // Міжнародний неврологічний журнал. – 2011. – №5(43). – С. 13–16.
5. Тромболитическая терапия при ишемическом инсульте: опыт российских неврологов. По итогам II Российского международного конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт» (17–20 сентября, г. Санкт-Петербург, Россия) / Н.А. Шамалов, Д.Р. Хасанова, И.А. Вознюк и др. // Здоров'я України. – 2007. – №23/1. – С. 10–13.
6. Implementation and outcome of thrombolysis with alteplase 3–4.5 h after an acute stroke: an updated analysis from SITS-ISTR / N. Ahmed, N. Wahlgren, M. Grond et al. // Lancet. Neurol. – 2010. – Vol. 9. – P 866–874.
7. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke / M. Castellanos, R. Leira, J. Serena et al. // Stroke. – 2003. – Vol. 34. – P. 40–46.
8. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke / W. Hacke, M. Kaste, E. Bluhmki et al. // The New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol. 359(13). – P. 1317–1329.
9. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association / E. Jauch, J.L. Saver, H.P. Adams et al. // Stroke. – 2013. – Vol. 44. – P. 870–947.
10. Lloyd-Jones D. Heart disease and stroke statistics - 2010 update: a report from the American Heart Association / D. Lloyd-Jones, R.J. Adams, T.M. Brown et al. // Circulation. – 2010. – Vol. 121. – e46–215.
11. Silva G. Biomarkers in neurology / G. Silva, K. Furie // Front. Neurol. Neurosci. – 2009. – №25. – P. 55–61.

12. Thom T. Heart disease and stroke statistics – 2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee / T. Thom, N. Haase, W. Rosamond et al. // *Circulation*. – 2006. – №113. – P. e85–151.
- References**
1. Dziak, L. A., & Tsurkalenko, E. S. (2009). Insul't u molodykh pacientov [Stroke in young patients]. *Zdorovia Ukrainy*, 5/1, 12–15. [in Ukrainian].
  2. Zozulia, Yu. P., Voloshyn, P. V., Mishchenko, T. S., & Dziak, L. A. (2005). *Suchasni pryntsyipy diagnostyky ta likuvannia khorykh iz hostrymy porushenniamy mozkovoho krovoobihu [Modern principles of diagnosis and treatment of patients with acute cerebrovascular circulation]*. Kyiv. [in Ukrainian].
  3. Suslina, Z. A., Varakin, Yu. A., & Vereshchahin, N. V. (2006). Sosudistye zabolovaniya golovnogo mozga [Vascular diseases of the brain]. *Epidemiologia. Osnovy profilaktiki*. Moscow. [in Russian].
  4. Khobzej, N. K., Golik, V. A., Gondulenko, N. A., Mishchenko, T. S. (2011). Osobennosti epidemiologii invalidnosti pri zabolovaniyakh nervnoj sistemy v Ukraine [Features of the epidemiology of disability in diseases of the nervous system in Ukraine]. *Mizhnarodnyi nevrolohichnyi zhurnal*, 5 (43), 13–16. [in Ukrainian].
  5. Shamalov, N. A., Khasanova, D. R., Voznyuk, I. A., et al. (2007). Tromboliticheskaya terapiya pri ishemicheskom insul'te: opyt rossijskikh nevrologov. Po itogam II Rossijskogo mezhdunarodnogo kongressa «Cerebrovaskulyarnaya patologiya i insul't» [Thrombolytic therapy for ischemic stroke: the experience of Russian neurologists. According to the results of the II Russian international congress «Cerebrovascular pathology and stroke»] *Zdorovia Ukrainy*, 23/1, 10–13. [in Ukrainian].
  6. Ahmed, N., Wahlgren, N., Grond, M., Hennerici, M., Lees, K. R., Mikulik, R., et al. (2010). Implementation and outcome of thrombolysis with alteplase 3–4,5 h after an acute stroke: an updated analysis from SITS-ISTR. *Lancet. Neurology*, 9, 866–874. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70165-4.
  7. Castellanos, M., Leira, R., Serena, J., Pumar, J. M., Lizasoain, I., Castillo, J., & Dávalos, A. (2003). Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*, 34, 40–46.
  8. Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., et al. (2008). Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 359(13), 1317–1329. doi: 10.1056/NEJMoa0804656.
  9. Jauch, E., Saver, J. L., Adams, H. P., Bruno, A., Connors, J. J., Demaerschalk, B. M., et al. (2013). Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44, 870–947. doi: 10.1161/STR.0b013e318284056a.
  10. Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., et al. (2010). Heart disease and stroke statistics – 2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 121, e46–215. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.19266.
  11. Silva, G., & Furie, K. (2009). Biomarkers in neurology. *Front. Neurol. Neurosci*, 25, 55–61.
  12. Thom, T., Haase, N., Rosamond, W., et al. (2006). Heart disease and stroke statistics – 2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 113, 85–151. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.171600.

**Сведения об авторах:**

Баранова Е.В., заочный аспирант каф. нервных болезней, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: bkvn86@i.ua.

Абрамов А.В., д. мед. н., профессор каф. патологической физиологии, Запорожский государственный медицинский университет. Дарий В.И., д. мед. н., профессор каф. нервных болезней, Запорожский государственный медицинский университет.

Надійшла в редакцію 04.11. 2014 р.