

CLINICAL PHARMACOGENOMICS STUDY: АНАЛИЗ НА ЕФЕКТА ОТ ПРИЛОЖЕНИЕТО НА NatAspin H ПРИ ПАЦИЕНТИ С ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО



Въведение

Vacis Tatarūnas

Expert of the European
Medicines Agency
Pharmacogenomics
(PGWP) group,
laboratory of Molecular
Cardiology of LUHS
Cardiology Institute

При физиологични условия кръвене-то спира в резултат на процеса на кръвосъсирване. В присъствието на тромбоцити и фибриноген, неразтворимият съсирек запечатва увредената зона. Когато става въпрос за кръвосъсирване при нормални условия, винаги е въввлечена и фибринолитичната система. Нейният основен компонент (плазминът) започва да разтваря вече сформираните кръвни съсиреци^[1]. Тип I инхибиторът на плазминогенния активатор (PAI-1) потиска фибринолитичния процес. Той инхибира превръщането на плазминоген в плазмин, увеличава стабилността на вече сформирания тромб и устойчивостта му към разтваряне, което води до блокиране на кръвоносния съд от тромба. Когато има дефицит на PAI-1 активността, както е случаят при редки генетични заболявания, това се манифестира като удължено кръвене^[1]. В края на последното столетие се установи, че PAI-1 активността увеличава риска от сърдечни и съдови заболявания^[2]. Увеличена PAI-1 активност се наблюдава при артериална тромбоза (около три пъти по-висока, отколкото при венозна), а също така и на местата на атеросклеротични лезии. Най-честа се установя-

ва такава повишена активност (на PAI-1) при пациенти с диабет тип 2 и затлъстяване^[4,6]. Няколко от PAI-1 генните варианти (генотипи) могат да повлияят на активността на този ензим в организма.

Вариантът PAI-1675 4G/5G е най-често проучван. PAI-1 активността на лицата с 5G/5G версия се счита за нормална. Носители на 4G/5G и 4G/4G версията имат по-висока PAI-1 активност. Тези пациенти често имат предразположение към диабет, артериална или венозна тромбоза, инфаркт на миокарда със ST елевация^[11,12]. PAI-1 активността може да бъде намалена от някои естествени активатори на фибринолитичната система. Един от тях е ензимът натокиназа, изолиран от японското сирене нато^[14]. Знаейки, че PAI-1 активността при хора с различен PAI-1 генотип е различна, се очаква и ефектът на натокиназата при различните генотипи да е различна.

Дизайнът на нашето проучване беше предназначен да установи дали продуктът НХ има позитивен ефект върху активността на фибринолитичната система и как тази активност се различва при различните генотипи.

Методи

Проучването е проведено в Кардиологичната клиника на Литовския университет по здравни науки (ЛУЗН) и сертифицираната Молекулярна кардиологична лаборатория на Кариологичния институт към ЛУЗН. Пациентите, подбрани да участват в проучването, са с функционален клас II на ИБС (исхемична болест на сърцето). Контролната група се формира от здрави хора на случаен принцип. Разрешение №BE-2-42 за проучването е издадено от Регионалната етична комисия за биомедицински проучвания в Каунас. По време на разговора с главния изследовател всички субекти бяха запознати с процеса на проучването. Пациентите, съгласили се да участват, са подписали формуляри за информирано съгласие, одобрени от Регионалната комисия по етика.

Пациентите, включени в проучването, приемаха в продължение на 6 месеца NatAspin H (1 капсула), която съдържа 3000 фибринови единици (165 mg) натокиназа и 6 mg от антиоксиданта хидрокситирозол, извлечен от маслиново дърво. При всяка визита пациентите бяха мониторираны по следните клинични показатели:

- PAI-1 плазмено ниво.

- Липидограма.
- Креатинин.
- Чернодробни ензими GOT (Glutamat Oksaloacetat Transaminase) и GPT (Glutamat Piruvat Transaminase).
- Обща кръвна картина с включени местове за кръвосъсрване (време на кръвене и време на съсирване) (SPA/TNS).
- Входящо определяне на генотипа (PAI-1675 4G/5G генотип) чрез DNA тестване.
- По време на първата и третата визита (след 6 месеца) е измервана дебелината на интима медиа на артерия каротис на шията.
- Генотип PAI-1 675 4G/5G е проучен също в произволна извадка от здрави хора.

Анализи

Резултатите са представени като средни \pm стандартно отклонение. Резултатите се считат за статистически значими при $p < 0.05$. Честотата на генотипа са изразени като процент.

Резултати

Общ преглед на клиничното състояние на пациента след 6 месеца от първия тест. Шест месеца след първия тест не са установени статистически значими промени в хематологичните и биохимични индикатори на тестваните пациенти (Табл. 1) (Табл. 2).

Ултразвуковото изследване на дебелината на съдовата интима медиа не показва статистически значими промени (Табл. 3).

Честота на PAI-1 генотипа в пробите от изследваните пациенти и здрави хора.

В нашата извадка пациенти с PAI-1 4G/4G генотип бе установен по-често, отколкото при случайна извадка от здрави индивиди ($p=0.35$), но 4G/5G генотипът бе по-често срещан при здрави индивиди ($p=0.26$). Резултатите са показани във *Фиг. 1*.

Влияние на генотипа за промените на PAI-1 плазмената концентрация след 6 месеца.

6 месеца след първата проба PAI-1 концентрацията в кръвта на тестваните пациенти беше значително по-ниска ($p=0.01$), 77 ± 45 ng/ml vs. 115 ± 57 ng/ml (*Фиг. 2*). Предвид генотипа PAI-1 концентрацията беше значимо редуцирана при пациенти с генотип 4G/5G р (67 ± 26 ng/ml vs. 112 ± 55 , $p=0.04$), а пациентите с 4G/4G генотип са показали тенденция (77 ± 47 ng/ml vs. 116 ± 57 ng/ml, $p=0.09$) (нивото на PAI-1 е намалено при пациенти с агресивни варианти, чийто брой сред здрави хора е 85.8 на сто). За пациентите 5G/5G PAI-1 концентрацията не се е променила сигнификантно ($p=0.76$).

Влияние на генотипа върху концентрацията на липопротеините

6 месеца след първия тест липидограмата на пациентите не се променя статистически значимо. Нивото на общия холестерол в кръвта намалява за пациентите с генотипи 4G/4G и 5G/5G ($p=0.3$). 5G/5G пациентите са показали намаление на липопротеините с ниска плътност ($p=0.2$), а пациентите с генотип 4G/4G – на концентрацията на триглицеридите ($p=0.4$). Концентрацията на липопротеините с висока

Table 1. Haematological changes of tested patients

Indicator	First test		After 6 months	
	Average	SN	Average	SN
WBC ($10^9/l$)	5,098	1,165	5,250	1,113
Neut ($10^9/l$)	3,019	1,018	2,963	0,848
Lymph ($10^9/l$)	1,525	0,374	1,670	0,343
Mono ($10^9/l$)	0,290	0,133	0,303	0,105
Eos ($10^9/l$)	0,145	0,609	0,173	0,124
Baso ($10^9/l$)	0,032	0,011	0,043	0,171
Luc ($10^9/l$)	0,088	0,033	0,098	0,033
RBC ($10^{12}/l$)	4,567	0,306	4,557	0,328
HGB (g/l)	138,50	9,367	139,43	10,483
HCT (proc.)	41,825	2,695	41,58	2,751
PLT ($10^9/l$)	277,67	80,656	252,04	44,167
MPV (fl)	8,758	0,969	8,53	1,159

Table 2. Changes of biochemical indicators of tested patients

Indicator	First test		After 6 months	
	Average	SN	Average	SN
CREA ($\mu\text{mol/l}$)	59,62	9,315	58,17	11,134
GPT (U/l)	31,08	21,819	31,09	18,491
GOT (U/l)	24,71	13,569	23,48	8,279
CHOL (mmol/l)	6,236	1,101	6,016	1,057
DTL (mmol/l)	1,882	0,463	1,810	0,487
MTL (mmol/l)	3,731	1,232	3,663	0,951
TGL (mmol/l)	1,864	2,936	1,541	0,872
SPA	105,571	19,435	102,03	15,470

Table 3. Neck vascular intima media thickness

Right carotid artery				
Indicator	First test		Final test	
	Average	SN	Average	SN
Arteria carotis communis	0,0793	0,0156	0,0796	0,0152
Arteria carotis ties stormeni	0,1083	0,0335	0,1027	0,0370
A. Carotis interna	0,070	0,0140	0,0665	0,0133
V max. right syst. (cm/sec.)	69,87	14,020	70,09	13,146
V max right diast. (cm/sec.)	27,91	8,124	29,52	9,765
Left carotid artery				
Indicator	First test		Final test	
	Average	SN	Average	SN
Arteria carotis communis	0,0822	0,0150	0,0817	0,0164
Arteria carotis ties stormeni	0,1150	0,0287	0,1113	0,0281
A. Carotis interna	0,0665	0,122	0,0639	0,0123
V max. left syst. (cm/sec.)	66,70	16,977	66,22	16,155
V max. left diast. (cm/sec.)	26,70	6,263	27,04	8,911

Figure 1. PAI-1 genotype frequency in the samples of healthy subjects and patients

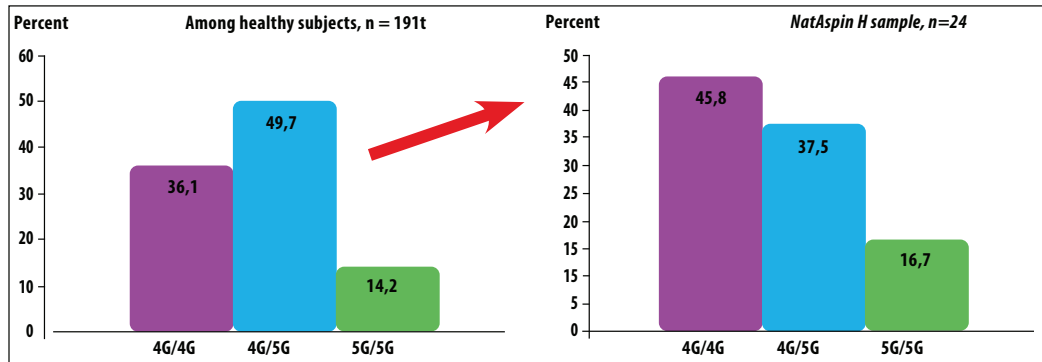


Figure 2. PAI-1 concentration changes in the blood of tested subjects during the first testing and after 6 months 6

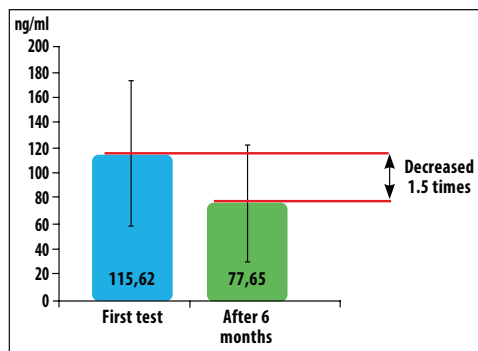
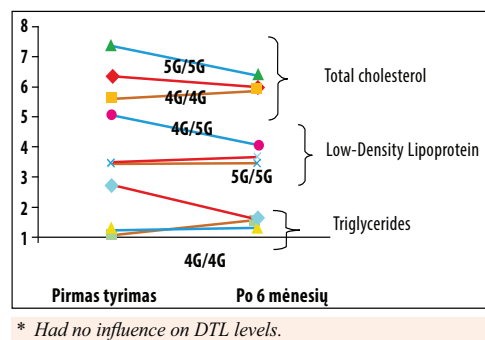
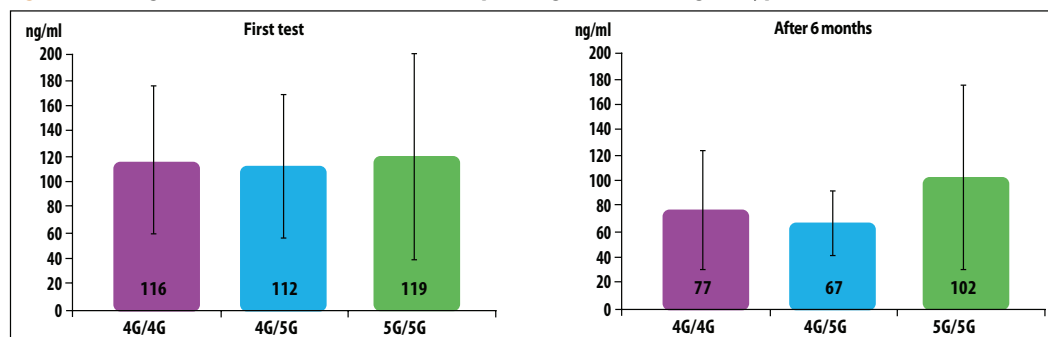


Figure 4. Lipoprotein concentration in the blood depending on PAI-1 genotype



* Had no influence on DTL levels.

Figure 3. Changes of PAI-1 levels in the blood depending on the PAI-1 genotype



плътност остава стабилна по време на целия период ($p=0.9$).

Обсъждане на резултатите

По време на проучването беше установено, че активността на PAI-1 в плазмата намалява за пациентите,

приемащи NatAspin H в продължение на 6 месеца, ние също така установихме намаление на концентрацията на липопротеините в зависимост от различните PAI-1 генотипи.

Анализирахме PAI-1 генотипите в групата на пациентите, а също и в референтната група от здрави индивиди. Високоактивният PAI-1 4G/4G генотип беше наблюдаван

по-често в групата на пациентите, а 4G/5G със средна активност беше по-често срещан в групата на здравите (49.7 процент). Ние смятаме, че такова разпределение на генотипите е асоциирано с по-висока податливост към атеросклероза при изследваните пациенти с функционален клас II исхемична болест на сърцето. По-ранни проучвания са показали, че PAI-1 е значително увеличен по време на възпалителен процес и при наличие на атеросклероза:

PAI-1 има значително въздействие върху активността на някои цитокини (interleukin 8, leukotriene B4), миграцията на моноцитите^[3] и способността на неутрофилите да фагоцитират^[5,8,9].

След 6 месеца прием на NatAspin H, концентрацията на PAI-1 при наблюдаваните пациенти беше значително редуцирана. За 4G/5G пациентите тя е намаляла най-много – с 1.7 пъти, а за пула 4G/4G пациенти – 1.5 пъти. Незначителна редукация е наблюдавана при 5G/5G пациентите, чийто брой в групата на здравите е бил само 14.2%. Съгласно референтната литература хората с 5G/5G трябва да имат по-ниска PAI-1 активност^[11].

След 6 месеца нивото на липидите в плазмата на тестваните субекти е намаляло. Нивото на общия холестерол в кръвта намалява за пациентите 4G/4G и 5G/5G. Триглицеридните нива намаляват за 4G/4G пациентите, а липопротеините с ниска плътност намаляват за пациентите с генотип 5G/5G. Приемът на натокиназа не е засягал концентрацията на липопротеините с висока плътност в кръвните тестове. PAI-1, в изобилие произвеждан в мастната тъкан^[7], е тясно свързан с фосфолипидите и фибрина^[10], натрупан в атеросклеротичните лезии. Фибри-

нът увеличава LDL афинитета и стимулира акумулацията на липиди в атеросклеротичната плака^[13]. При намалената функция на фибринолитичната система в засегнатите от атеросклерозата места възниква дисфункция на ендотелата поради натрупания фибрин по стените на кръвоносните съдове. Това причинява процес на възпаление и клетъчна миграция. Организмът започва да произвежда колаген, увеличава пропускливостта на съдовете, промотира процес на възпаление, агрегация на тромбоцити, кръвосъсирване и инхибиция на фибринолизата^[13].

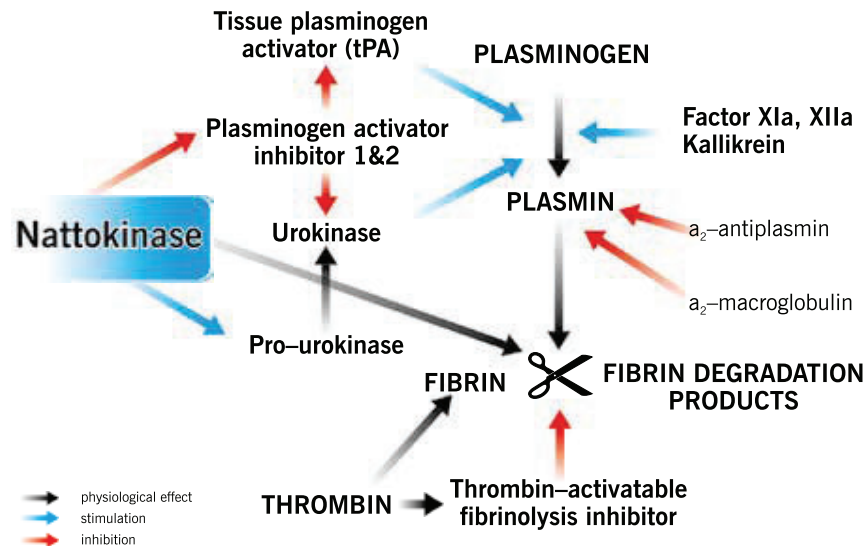
Хвърлихме кратък поглед на процесите в организма, контролирани от множество компоненти, свързани помежду си. Решаването на проблема с индивидуализирано лечение и профилактика е възможно само след комплексен анализ на системата на кръвосъсирване и фибринолиза и разглеждане ролята на възпалителния процес.

Обобщение и препоръки

След 6 месеца плазмената концентрация на PAI-1 сигнификантно намалява при всички субекти на проучването. В зависимост от генотипа, най-изявен намаляващ ефект по отношение на PAI-1 кръвното ниво беше наблюдаван при пациенти с генотип PAI-1 4G/4G и 4G/5G. Максимална редукция на общия холестерол и липопротеините с ниска плътност възникна при PAI-1 5G/5G пациенти. Нивата на триглицеридите намаляха при 4G/4G пациентите.

Клиничните характеристики на наблюдаваните пациенти не се промениха значително.

СХЕМА НА МЕХАНИЗМА NATOKINASE ЗА РАЗТВАРЯНЕ НА КРЪВНИ СЪСИРЕЦИ*



*Martin Milner, N.D., and Kouhei makise, M.D. Natto and Its Active Ingredient Nattokinase. *Alern & Complementary therapies*; 158- Jun 2002.

Препоръчваме NatAspin H при пациенти:

- За редуциране на общия холестерол, липопротеините с ниска плътност и триглицеридите в кръвта.
- За превенция на атеросклерозата и атеросклеротичната съдова стеноза/рестеноза.
- За намаляване на артериалния и венозен тромбозен риск.

Препечатан материал от официалния журнал на Литовското гружество по вътрешни болести!

книзопус:

1. Ming-Wai Tai, Burgunda V. Sweet. Nattokinase for prevention of thrombosis. *Am J Health-Syst Pharm* – Vol 63 Jun 15. 2006.

2. Chien-Hsun Hsia, Ming Ching Shen et al. Nattokinase decreases plasma level of fibrinogen, factor VII and factor VIII in human subjects. *Nutrition Research* 2009; 29:190-196.
3. Sumi H, Hamada H. et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase, *Acta Haematol* 1990, 84(3): 139-43.
4. Pais E, Alexy T. et al. Effects of Nattokinase, a pro-fibrinolytic, on red blood cell aggregation and whole blood viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35(1-2): 139-42.
5. Fujita M., Ito Y et al. Characterization of Nattokinase-degraded Products from Human Fibrinogen or Cross-linked Fibrin. *Fibrinolysis* 1995; 9: 157-164.
6. Chisato Nagata. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *International Journal of Epidemiology* 2000; 29: 832-836.
7. Yasuhiro Suzuki, Kazunao Kondo et al. Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening. *Nutrition* 2003; volume 19 Nr. 3.
8. Yong Peng, Qing Huang et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douche, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2003; 134: 45-52.
9. A. Valavičius. Plaučių arterijos tromboembolija: liga su daugybe kaukių. *Gydymo menas*, 2007 Nr.4. <http://www.medicine.lt/index.php?pagrid=leidiniai&subid=gm&strid=6129>.