

Прогностическое значение соотношения количества циркулирующих эндотелиальных апоптотических микрочастиц и прогениторных проангиогенных мононуклеаров у пациентов с хронической сердечной недостаточностью



А. Е. Березин, А. А. Кремзер,
Т. А. Самура, Ю. В. Мартовицкая

Запорожский государственный медицинский университет

Цель работы — оценить прогностическое значение соотношения циркулирующих эндотелиальных апоптотических микрочастиц (ЭМА) и эндотелиальных прогениторных мононуклеаров (ЭПМ) для кумулятивной выживаемости у больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

Материалы и методы. В исследование включено 154 больных с ХСН II–IV функциональных классов (ФК). Фенотипирование популяций ЭАМ и мононуклеарных клеток осуществлялось методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты и обсуждение. Медиана отношения ЭАМ/ЭПМ у выживших и умерших пациентов составила 8,4 (95% ДИ 7,6–9,2) и 78,9 (95% ДИ 53,0–116,6) соответственно ($p = 0,001$). Для последующего анализа отношение ЭАМ/ЭПМ было представлено в виде квартилей (Q): Q1 (Me = 9,7; 95% ДИ 5,8–10,6); Q2 (Me = 18,2; 95% ДИ 11,0–22,2); Q3 (Me = 41,4; 95% ДИ 22,5–57,8); Q4 (Me = 73,0; 95% ДИ 58,9–96,6). Используя метод оценки выживания Каплана – Мейера, обнаружили существенное расхождение кривых выживания для пациентов с четвертым квартилем (Q4) отношения ЭАМ/ЭПМ по сравнению с больными, для которых величина последнего соответствовала более низким квартилям (Q1–Q3).

Выводы. У пациентов с ХСН II–IV ФК верхний квартиль значений отношения ЭАМ/ЭПМ по сравнению с нижними квартилями ассоциируется с повышением риска возникновения общей смерти, смерти вследствие ХСН и повторной госпитализации, вызванной прогрессированием ХСН.

Ключевые слова: эндотелиальные апоптотические микрочастицы, проангиогенные мононуклеарные клетки, хроническая сердечная недостаточность, выживаемость, госпитализация, прогноз.

Хроническую сердечную недостаточность (ХСН) продолжают рассматривать как ведущую причину кардиоваскулярной смертности [23, 30]. Дисфункция эндотелия играет важную роль в возникновении и прогрессировании многих кардиоваскулярных заболеваний и их осложнений, включая ХСН [1, 32]. Предшествующие исследования пока-

зали, что повреждение монослоя эндотелиоцитов, вызванное различными причинами, сопровождается значительным повышением циркулирующего уровня эндотелиальных апоптотических микрочастиц (ЭАМ) [13]. ЭАМ представляют собой гетерогенную популяцию микровезикул, которая высвобождается из эндотелиоцитов в ответ на их активацию или вследствие апоптоза [14]. Установлено, что ЭАМ участвуют в межклеточном взаимодействии, в частности, путем трансфера биологически активных мессенджеров и сигнальных молекул, а именно липидов, интегринов, цитокинов, ряда ферментов, мРНК и микро-РНК, которые, в свою очередь, являются модуляторами

Стаття надійшла до редакції 13 квітня 2014 р.

Березин Александр Евгенович, д. мед. н., проф. кафедры
69000, м. Запоріжжя, просп. Маяковського, 26

© О. Е. Березин, О. О. Кремзер, Т. О. Самура, Ю. В. Мартовицкая, 2014

широкого спектра биологических процессов, таких как воспаление, иммунный ответ, коагуляция, атерогенез [21, 26]. Увеличение уровня циркулирующих ЭАМ обнаружено у пациентов с острым коронарным синдромом, инфарктом миокарда, асимптомным атеросклерозом, артериальной гипертензией (АГ), дислипидемией, инсультом, фибрилляцией предсердий, а также сепсисом, ревматическими и онкологическими заболеваниями, сахарным диабетом (СД), ожирением, хронической болезнью почек [16, 17, 29].

Циркулирующие эндотелиальные прогениторные мононуклеары (ЭПМ) участвуют в репаративных процессах, включая реэндотелизацию фрагментов васкулярного повреждения, ремоделирование внеклеточного матрикса, неоваскуляризацию и ангиогенез [9, 12]. Мобилизация ЭПМ из костного мозга и периферических тканей регулируется широким спектром провоспалительных цитокинов, нейрогормонов, сигнальных молекул, включая микро-РНК, гликопептиды и продукты оксидантного стресса [1, 3, 11]. Также как ЭАМ, циркулирующие проангиогенные ЭПМ различного происхождения вовлекаются в процессы репарации тканей, васкулогенеза и васкулярного ремоделирования [6]. Поскольку между уровнем ЭПМ с фенотипом CD34⁺CD45⁻ и выживаемостью пациентов с ХСН не обнаружено тесной взаимосвязи, то, вероятно, иные субпопуляции ЭПМ могли бы быть кандидатами в прогностические маркеры ХСН [2]. В качестве последних рассматриваются проангиогенные ЭПМ, экспрессирующие антигены CD34⁺ и VEGFR-2⁺ (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2), CD133⁺, CD14⁺, Tie2⁺ (специфических лиганд для тирозинкиназы). Несмотря на то, что уровень циркулирующих ЭАМ рассматривается как достаточно чувствительный маркер дисфункции эндотелия и ремоделирования [13, 17], соотношение ЭАМ и ЭПМ могло бы явиться более надежным индикатором дисбаланса между про- и антиангиогенным ответом при реализации кардиоваскулярного ремоделирования с возможным прогностическим потенциалом [15, 33].

Цель работы — оценка прогностического потенциала соотношения количества циркулирующих эндотелиальных апоптотических микрочастиц и прогениторных проангиогенных мононуклеаров у пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

Материалы и методы

В исследование включено 154 пациента (из них 86 мужчин) в возрасте 48–62 года с ХСН II–IV функциональных классов (ФК) по классификации NYHA (New York Heart Association). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения

из исследования были: инфаркт миокарда с зубцом Q или нестабильная стенокардия на протяжении 30 сут до включения в исследование, стенокардия напряжения IV ФК, неконтролируемая АГ, декомпенсированный СД с необходимостью проведения инсулинотерапии, тяжелые заболевания печени и почек, онкологические заболевания, симптоматическая АГ, индекс массы тела (ИМТ) более 30 кг/м² и менее 15 кг/м², инфекционные заболевания в течение 3 нед до скринирования, перенесенное нарушение мозгового кровообращения, черепно-мозговая травма в течение 3 мес, критические стенозы и окклюзии коронарных артерий, требующие немедленного проведения аортокоронарного шунтирования (АКШ) или эндоваскулярного вмешательства, уровень креатинина плазмы крови более 440 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) менее 35 мл/(мин · 1,73 м²) и любые другие нарушения, которые, по мнению исследователей, могли препятствовать участию пациентов в исследовании, а также отказ от участия в исследовании по любым причинам.

Ишемическая природа ХСН устанавливалась в случае ее непосредственной связи с ранее документированным инфарктом миокарда, а также при наличии позитивного результата мультиспиральной компьютерной томографии-ангиографии (n = 43) и/или рентгенконтрастного ангиографического исследования коронарных артерий (n = 54).

В качестве клинических точек проанализированы случаи кардиоваскулярной смерти и смерти от всех причин, а также все повторные госпитализации вследствие прогрессирования ХСН на протяжении 3 лет наблюдения.

Показатели систолической и диастолической функции оценивали с помощью трансторакальной эхокардиографии по общепринятой методике [31] на аппарате Acuson (Siemens, Германия) в В-режиме эхолокации и в режиме тканевой доплерографии. Конечнодиастолический и конечносистолический объемы левого желудочка (ЛЖ) измеряли методом Симпсона. Тканевую доплерографию проводили в 4-, 3- и 2-камерной проекциях в каждом из 16 сегментов ЛЖ и в 4 точках митрального кольца: у основания заднеперегородочной, боковой, нижней и передней стенок ЛЖ [28]. Измеряли пиковые систолическую (Sm), раннюю (Em) и позднюю (Am) диастолические миокардиальные скорости митрального кольца с последующим расчетом отношения скорости раннего диастолического наполнения ЛЖ (E) к Am (E/Am) и Em (E/Em).

СКФ вычисляли по формуле MDRD-6 [19].

Содержание N-терминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) измеряли иммуноэлектрохемилюминесцентным методом с использованием наборов производства R&D Systems (США) на анализаторе Elecsys 1010 (Roche, Германия). Концентрацию общего холе-

стерина (ХС) и ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) измеряли ферментативным методом. Содержание ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) рассчитывали по формуле W. T. Friedewald (1972).

Фенотипирование популяций ЭАМ и мононуклеарных клеток осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител, меченных флуорохромами FITC (флуоресцеин изотиоцианат) или двойной меткой FITC/PE (фикоэритрин) (BD Biosciences, США), к антигенам CD31, annexin V+, CD45, CD34, CD14, Tie2 и CD309(VEGFR2) по методологии HD-FACS (High-Definition Fluorescence Activated Cell Sorter) с удалением эритроцитов лизирующим буфером в соответствии с протоколом гейтирования ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering sequential) [35]. Для каждой из проб анализировали 500 тыс. событий. ЭАМ фенотипировали как CD31⁺/annexin V⁺ микрочастицы [18]. Проангиогенный фенотип циркулирующих ЭПМ идентифицировали как экспрессию CD14⁺CD309(VEGFR2)⁺Tie2⁺ антигенов. Результаты скатерограмм, полученные при продольном и поперечном рассеивании лазерного луча в проточном цитофлуометре, анализировали по принципу Булина (Boolean principles) для двойных или тройных позитивных событий.

Исследователи строго придерживались всех требований, предъявляемых к клиническим испытаниям в соответствии с Хельсинкской декларацией прав человека (1964), Конференцией по гармонизации надлежащей клинической практики (GCP-ICH), Конвенции Совета Европы о защите прав и достоинства человека в связи с использованием достижений биологии и медицины, Конвенцией о правах человека и биомедицине, включая Дополнительный протокол к Конвенции о биомедицинских исследованиях, и законодательством Украины.

Статистическую обработку результатов проводили в системе SPSS. Все данные представлены как среднее (M) и ошибка средней (m) или 95 % доверительный интервал (ДИ); медиана (Me) и межквартильный интервал. Гипотезу о нормальности распределения исследуемых показателей проверяли с использованием критерия Шапиро—Уилка и Колмогорова—Смирнова. При сравнении групп больных по основным показателям использовали непарный t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна—Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп применяли парный критерий Вилкоксона. Сравнения категориальных переменных между группами проводили с использованием теста χ^2 и точного критерия Фишера F. Концентрации циркулирующих ЭАМ, ЭПМ, NT-proBNP не имели нормального распределения, тогда как распределение содержания общего ХС и его фракций отличалось нормальным харак-

тером. Потенциальные факторы, которые могли бы быть связаны с изменением отношения ЭАМ/ЭПМ, первоначально определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), а затем все идентифицированные факторы с уровнем $p < 0,1$ дополнительно изучали в многофакторном дисперсионном анализе. Величину отношения шансов (ОШ) и 95 % ДИ рассчитывали для всех независимых предикторов увеличения отношения ЭАМ/ЭПМ. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Медиана периода наблюдения за пациентами, включенными в исследование, составила 2,18 года (размах = 1,2—3,0 года). В течение этого периода умер 21 пациент (1-я группа). Непосредственно с прогрессированием ХСН были связаны 18 смертельных случаев. 2-ю группу составили 133 выживших за время проведения исследования пациента. В связи с прогрессированием ХСН за время наблюдения госпитализированы 106 больных. Всего отмечено 17 клинических точек в когорте умерших и 89 — в когорте выживших пациентов. В табл. 1 приведены основные клинические, демографические и антропометрические сведения о больных, принявших участие в исследовании. Не отмечено существенных различий между когортами пациентов с ХСН в зависимости от возраста, гендерной принадлежности, ИМТ, СКФ, содержания гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}), уровней глюкозы натощак, креатинина крови, общего ХС, ХС ЛПНП и ХС ЛПВП, количества пораженных коронарных артерий, уровней офисного артериального давления (АД), ЧСС (см. табл. 1). Частота встречаемости кардиоваскулярных факторов риска, таких как курение, АГ, дислипидемия, СД 2 типа, в двух когортах больных также достоверно не различалась. Обращает на себя внимание отсутствие достоверных различий между значениями показателей E/Am и E/Em в обеих когортах больных, хотя в когорте умерших пациентов по сравнению с выжившими лицами обнаружено статистически значимое снижение фракции выброса (ФВ) ЛЖ. Кроме того, уровень циркулирующего NT-proBNP был достоверно выше у умерших лиц. Пациенты обеих групп получали лечение в соответствии с современными рекомендациями, различий по фармакотерапии между группами не было (см. табл. 1).

Анализ полученных данных показал, что медиана уровня циркулирующих ЭАМ в когортах выживших и умерших пациентов составляла 0,286 клеток/мл (95 % ДИ 0,271—0,309 клеток/мл) и 0,673 клеток/мл (95 % ДИ 0,65—0,74 клеток/мл) ($p < 0,001$). Количество ЭАМ в крови позитивно ассоциировалось с ФК ХСН ($r = 0,514$; $p = 0,001$), NT-proBNP ($r = 0,416$; $p = 0,001$), наличием СД

Т а б л и ц а 1

Общая характеристика пациентов, принявших участие в исследовании

Показатель	Умершие (n = 21)	Выжившие (n = 133)
Возраст, годы	57,20 ± 6,70	59,50 ± 7,30
Мужчины	12 (57,1 %)	74 (55,6 %)
ИМТ, кг/м ² (95 % ДИ)	23,7 (22,5–27,3)	24,2 (22,0–27,9)
Систолическое АД, мм рт. ст.	129 ± 4	135 ± 5
Диастолическое АД, мм рт. ст.	77 ± 5	76 ± 4
ЧСС, в 1 мин	76 ± 6	68 ± 3
АГ	12 (57,1 %)	61 (45,9 %)
СД 2 типа	8 (38,1 %)	45 (33,8 %)
ФК ХСН по NYHA		
II	6 (28,6 %)	35 (26,3 %)
III	9 (42,8 %)	65 (48,9 %)
IV	6 (28,6 %)	33 (24,8 %)
Приверженность к курению	7 (33,3 %)	24 (29,3 %)
ФВ ЛЖ, %	42,80 ± 0,76	55,40 ± 0,80*
Е/Am	16,60 ± 0,94	16,5 ± 1,20
Е/Em	16,60 ± 1,00	16,6 ± 0,84
Количество пораженных коронарных артерий		
Одна	5 (23,8 %)	24 (18,0 %)
Две	8 (38,1 %)	54 (40,1 %)
Три и больше	8 (38,1 %)	55 (41,4 %)
СКФ, мл/(мин · 1,73 м ²) (95 % ДИ)	82,1 (69,9–93,1)	85,2 (70,3–112,5)
НЬА _{1с} , % (95 % ДИ)	6,3 (4,4–9,0)	7,0 (4,3–9,2)
Глюкоза натощак, ммоль/л (95 % ДИ)	4,80 (3,6–8,5)	5,40 (3,4–9,1)
Креатинин, мкмоль/л (95 % ДИ)	70,5 (59,6–88,3)	74,9 (65,1–90,3)
Общий ХС, ммоль/л (95 % ДИ)	5,3 (4,6–6,0)	5,0 (4,2–5,8)
ХС ЛПНП, ммоль/л (95 % ДИ)	3,60 (3,20–4,18)	3,02 (2,80–3,90)
ХС ЛПВП, ммоль/л (95 % ДИ)	0,94 (0,92–1,06)	0,88 (0,82–0,97)
Дислипидемия	9 (42,8 %)	52 (39,1 %)
NT-proBNP, пг /мл (95 % ДИ)	1533,6 (644,5–2560,6)	1031,2 (704,8–1560,7)*
Медикаментозная терапия		
ИАПФ/АРА	21 (100 %)	133 (100 %)
Ацетилсалициловая кислота	19 (90,5 %)	121 (91,0 %)
Другие антиагреганты	2 (9,5 %)	12 (9,0 %)
Статины	14 (66,7 %)	80 (60,2 %)
Метформин	8 (38,1 %)	45 (33,8 %)
Диуретики	18 (85,7 %)	121 (91,0 %)
Антагонисты минералокортикоидных рецепторов	9 (42,9 %)	70 (52,6 %)

* Различия относительно умерших больных статистически значимы (p < 0,05).

ИАПФ – ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, АРА – антагонисты рецепторов ангиотензина II.

2 типа ($r=0,402$; $p=0,003$) и многососудистого поражения коронарных артерий ($r=0,362$; $p=0,001$), E/Am ($r=0,360$; $p=0,001$), E/Em ($r=0,344$; $p=0,001$), гендерной принадлежностью ($r=0,318$; $p<0,001$ для мужчин), общим ХС ($r=0,313$; $p=0,001$), возрастом пациентов ($r=0,275$; $p=0,001$), приверженностью к курению ($r=0,212$; $p=0,001$) и негативно — с ФВ ЛЖ ($r=-0,496$; $p=0,001$) и СКФ ($r=-0,408$; $p=0,003$).

Медиана (Ме) уровня циркулирующих ЭПМ в когортах выживших и умерших пациентов составила 0,28 клеток/мкл (95 % ДИ 0,26–0,30 клеток/мкл) и 0,12 клеток/мкл (95 % ДИ 0,098–0,14 клеток/мкл) соответственно ($p=0,001$). Обнаружена позитивная ассоциация между количеством ЭПМ и ФВ ЛЖ ($r=0,639$; $p=0,001$), E/Em ($r=0,52$; $p=0,001$), СКФ ($r=0,486$; $p=0,002$) и негативная ассоциация с ФК ХСН ($r=-0,657$; $p=0,001$), наличием СД 2 типа ($r=-0,610$; $p=0,001$), возрастом ($r=-0,398$; $p=0,001$), уровнями креатинина ($r=-0,394$; $p=0,001$), NT-proBNP ($r=-0,473$; $p=0,001$), ХС ЛПНП ($r=-0,354$; $p=0,001$), общего ХС ($r=-0,258$; $p=0,043$), приверженностью к курению ($r=-0,285$; $p=0,042$), ИМТ ($r=-0,272$; $p=0,046$).

Медиана отношения ЭАМ/ЭПМ у выживших и умерших пациентов составила 8,4 (95 % ДИ 7,6–9,2) и 78,9 (95 % ДИ 53,0–116,6) соответственно ($p=0,001$). Отношение ЭАМ/ЭПМ позитивно ассоциировалось с ФК ХСН ($r=0,62$; $p=0,001$), NT-proBNP ($r=0,513$; $p=0,001$), наличием СД 2 типа ($r=0,422$; $p=0,001$), многососудистым поражением коронарных артерий ($r=0,432$; $p=0,001$), E/Am ($r=0,387$; $p=0,002$), E/Em ($r=0,356$; $p=0,002$), гендерной принадлежностью ($r=0,396$; $p<0,001$ для мужчин), уровнем общего ХС ($r=0,322$; $p=0,001$), возрастом ($r=0,301$; $p=0,001$), приверженностью к курению ($r=0,287$; $p=0,001$) и негативно — с ФВ ЛЖ ($r=-0,506$; $p=0,001$) и СКФ ($r=-0,502$; $p=0,001$). Не обнаружено существенной взаимосвязи между отношением ЭАМ/ЭПМ и уровнем глюкозы натощак, HbA_{1c}, уровнем офисного АД, семейным анамнезом по ишемической болезни сердца (ИБС), а также особенностями медикаментозного лечения. Для последующего анализа отношение ЭАМ/ЭПМ было представлено в виде квартилей (Q): Q1 (Ме = 9,7; 95 % ДИ 5,8–10,6); Q2 (Ме = 18,2; 95 % ДИ 11,0–22,2); Q3 (Ме = 41,4; 95 % ДИ 22,5–57,8); Q4 (Ме = 73,0; 95 % ДИ 58,9–96,6).

Используя метод оценки выживания Каплана — Мейера, обнаружили существенное расхождение кривых выживания для пациентов с четвертым квартилем (Q4) отношения ЭАМ/ЭПМ по сравнению с больными, для которых величина последнего соответствовала более низким квартилям (Q1–Q3) (рисунок). Расхождение кривых выживаемости, связанное с накоплением клинических точек, достигало статистической значимости через 50 нед

после начала исследования ($p<0,001$). Вместе с тем не установлено различий в выживаемости между когортами пациентов с величиной отношения ЭАМ/ЭПМ в пределах Q1 и Q2, а также Q2 и Q3. При этом статистически значимое различие в выживаемости между когортами пациентов с отношением ЭАМ/ЭПМ в пределах Q1 и Q3 было достигнуто только к концу периода наблюдения.

Мультивариантный логистический регрессионный анализ показал, что основными факторами, оказывающими влияние на показатели общей смерти, смерти вследствие ХСН, а также повторной госпитализации, связанной с прогрессированием ХСН, явились: уровень циркулирующих ЭАМ и ЭПМ, отношение ЭАМ/ЭПМ, содержание NT-proBNP, ФК ХСН, ФВ ЛЖ, СД 2 типа, а также многососудистое поражение коронарных артерий. Следует отметить, что отношение ЭАМ/ЭПМ обладало наиболее высокой независимой предсказующей ценностью для показателя общей смерти (ОШ = 1,69; 95 % ДИ 1,40–1,92; $p=0,001$), смерти вследствие ХСН (ОШ = 1,38; 95 % ДИ (1,20–1,54); $p=0,001$), а также повторной госпитализации, связанной с прогрессированием ХСН (ОШ = 1,32; 95 % ДИ 1,18–1,66; $p=0,001$) (табл. 2). При этом ЭАМ, ЭПМ, ФК ХСН, NT-proBNP и ФВ ЛЖ оставались статистически значимыми факторами, обладающими независимым влиянием на показатели общей смерти, смерти вследствие ХСН, а также повторной госпитализации, связанной с прогрессированием ХСН. Напротив, СД 2 типа и многососудистое поражение коронарных артерий не подтвердили своей независимой прогностической ценности.

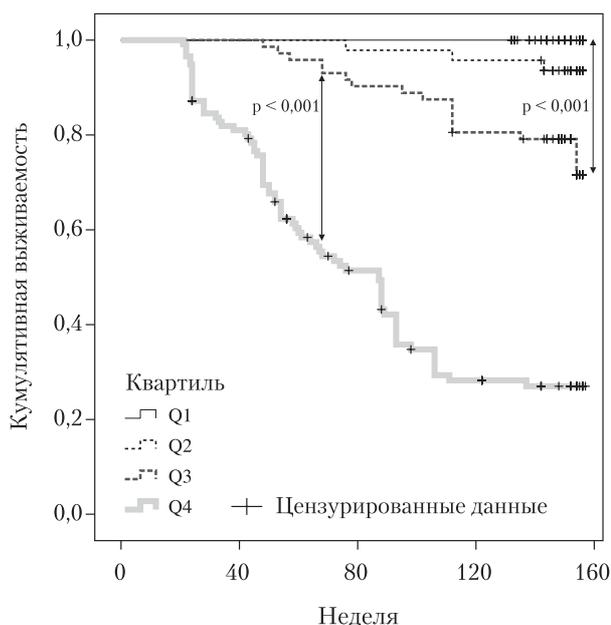


Рисунок. Кумулятивная выживаемость в четырех когортах пациентов с ХСН в зависимости от квартиля отношения ЭАМ/ЭПМ

Т а б л и ц а 2

Факторы, независимо ассоциирующиеся с показателями общей смерти, смерти, связанной с ХСН, и повторной госпитализации вследствие ХСН на протяжении трех лет наблюдения. Результаты логистического регрессионного анализа

Показатель	Смерть от всех причин			Смерть, связанная с ХСН			Повторная госпитализация вследствие ХСН		
	ОШ	95 % ДИ	p	ОШ	95 % ДИ	p	ОШ	95 % ДИ	p
ЭАМ	1,58	1,20–1,88	0,001	1,22	1,12–1,36	0,001	1,20	1,11–1,32	0,001
ЭПМ	1,21	1,06–1,43	0,002	1,15	1,03–1,28	0,001	1,06	1,02–1,09	0,001
ЭАМ/ЭПМ	1,69	1,40–1,92	0,001	1,38	1,20–1,54	0,001	1,32	1,18–1,66	0,001
ФК ХСН по NYHA	1,12	1,01–1,24	0,05	1,18	1,05–1,30	0,001	1,12	1,07–1,22	0,001
NT-proBNP	1,09	1,02–1,16	0,002	1,42	1,22–1,73	0,006	1,44	1,28–1,67	0,002
ФВ ЛЖ	1,06	1,01–1,12	0,001	1,15	1,12–1,18	0,014	1,22	1,07–1,45	0,016
СД 2 типа	1,05	1,01–1,11	0,001	1,03	0,93–1,10	0,32	1,04	0,97–1,06	0,42
Многососудистое поражение коронарных артерий	1,02	0,88–1,09	0,56	1,01	0,92–1,07	0,27	1,14	1,03–1,26	0,012

Т а б л и ц а 3

Предсказуемая ценность соотношения количества циркулирующих ЭАМ и прогениторных проангиогенных мононуклеаров для комбинированной конечной точки (общая смерть и повторная госпитализация в связи с прогрессированием ХСН)

Модель	ОШ	95 % ДИ	p
1: ЭАМ/ЭПМ	1,62	1,12–1,92	0,001
2: ЭАМ/ЭПМ + NT-proBNP	1,56	1,09–1,77	0,003
3: ЭАМ/ЭПМ + NT-proBNP + ФК ХСН	1,42	1,12–1,61	0,001
4: ЭАМ/ЭПМ + NT-proBNP + ФК ХСН + ФВ ЛЖ	1,25	1,07–1,62	0,003
5: ЭАМ/ЭПМ + NT-proBNP + ФК ХСН + ФВ ЛЖ + СД 2 типа	1,09	1,02–1,17	0,002
6: ЭАМ/ЭПМ + NT-proBNP + ФК ХСН + ФВ ЛЖ + СД 2 типа + многососудистое поражение коронарных артерий	1,11	1,01–1,19	0,001

В многофакторной предсказующей модели мы исследовали прогностическую ценность комбинаций переменных, идентифицированных ранее, по отношению к клиническим конечным точкам — общей смерти, смерти вследствие ХСН, а также повторной госпитализации, связанной с прогрессированием ХСН (табл. 3). Оказалось, что отношение ЭАМ/ЭПМ сохраняет свой прогностический потенциал как независимый фактор риска возникновения неблагоприятных клинических исходов, тогда как добавление в прогностическую модель таких факторов, как NT-proBNP, ФК ХСН, ФВ ЛЖ, СД 2 типа и многососудистое поражение коронарных артерий, не способствует повышению дискриминационной значимости отношения ЭАМ/ЭПМ.

Обсуждение

Циркулирующие ЭАМ занимают центральное место в регулировании репаративных процессов,

реализации провоспалительной активации, поддержании коагуляционного потенциала крови при различных кардиоваскулярных заболеваниях [8]. Предшествующими исследованиями установлена триггерная роль ЭАМ в формировании дисфункции эндотелия, которая реализуется посредством супрессии продукции оксида азота, повышением его деградации, что непосредственно влияет на механические качества эндотелия сосудов [13, 17]. ЭПМ активно участвуют в воспалительных и репаративных процессах, а также модулируют ангиогенез и апоптоз эндотелиоцитов [20, 24]. В этой связи ЭАМ и ЭПМ рассматриваются как маркеры активации эндотелия и формирования эндотелиальной дисфункции. Тем не менее, прогностическая роль ЭАМ и ЭПМ остается не вполне установленной [9, 11, 16]. В настоящем исследовании получено подтверждение того факта, что отношение ЭАМ/ЭПМ обладает более высокой предсказующей ценностью для клинических исходов у

больных с ХСН, чем каждый из этих биомаркеров. Более того, увеличение отношения ЭАМ/ЭПМ ассоциируется с большей интенсивностью накопления кардиоваскулярных событий, что приводит к появлению достоверного расхождения кривых выживаемости Каплана — Мейера. При этом наиболее высокий дискриминационный потенциал отмечается у пациентов с величиной ЭАМ/ЭПМ в пределах четвертого квартиля. Регрессионная предикторная модель не подтвердила преимуществ мультимаркерного подхода, основанного на добавлении к отношению ЭАМ/ЭПМ таких факторов, как NT-proBNP, ФВ ЛЖ или ФК ХСН, что свидетельствует о независимом влиянии ЭАМ/ЭПМ на отдаленный прогноз. В целом, хотя клеточные механизмы реализации эффекта ЭАМ и ЭПМ остаются не вполне понятными, можно предположить, что повышение соотношения последних у пациентов с ХСН отражает степень снижения васкулярного репаративного потенциала и тяжесть дисфункции эндотелия, что, в свою очередь, дает возможность объективизировать определение стадии развития заболевания. Этот тезис подтверждается полученными данными о прогностической ценности отношения ЭАМ/ЭПМ для общей смерти, смерти вследствие ХСН, а также повторной госпитализации, связанной с прогрессированием ХСН. Вместе с тем необходимо отметить, что ЭАМ и ЭПМ, обладая достаточно высокой диагностической ценностью для кардиоваскулярных и онкологических заболеваний, демонстрируют существенные ограничения для последующей клинической интерпретации. Так, в настоящее время не существует стандартизованных методов фенотипирования ЭАМ и ЭПМ, что придает вопросу воспроизводимости методики чрезвычайно высокое значение [4, 7, 25]. Хотя методология High-Definition FACS является общепризнанным методом фенотипирования различных типов клеток, возможность получения ложноположительных результатов при использовании двух и более видов флуорохромов также не исключается [35]. Вероятно, некоторые противоречия в результатах, полученных другими исследователями, могли бы быть объяснены использованием различных комбинаций флуорохромов для маркирования поверхностных антигенов [2, 10, 32]. С другой стороны, коморбидные состояния могут реализовывать свое влияние на клинические исходы путем изменения скорости мобилизации, дифференцировки и клиренса ЭАМ и ЭПМ, что также необходимо учитывать при интерпретации полученных данных. Так, А. С. Alba и соавторы [2] сообщили о том, что пациенты без СД по сравнению с больными СД 2 типа имеют преимущества в выживании, непосредственно связанные со снижением содержания CD34⁺VEGFR2⁺ ЭПМ. По нашим данным, наоборот, уменьшение уровня циркулирующих ЭПМ с фенотипами CD14⁺CD309⁺ и CD14⁺CD309⁺Tei2⁺ позитивно ассоциируется с количеством факторов кардиоваскулярного риска [5]. Таким образом, изолированная интерпретация изменений концентрации ЭАМ или ЭПМ может привести к противоречивым выводам. В этой связи расчет соотношения этих биомаркеров выглядит привлекательно с целью более точного описания дисбаланса между апоптозом эндотелиоцитов и дифференцировкой прогениторных эндотелиальных мононуклеаров [33]. С. Y. Hsu и соавторы (2013) [15] предпринимали попытку использовать соотношение циркулирующих апоптотических микрочастиц и CD34⁺ прогениторных клеток для оценки тяжести поражения органов-мишеней у пациентов с АГ. Однако прогностическая роль подобного подхода не была изучена [16]. В целом мы полагаем, что обнаруженный новый биологический маркер (отношение ЭАМ/ЭПМ) с достаточно высоким прогностическим потенциалом для пациентов с ХСН требует более детального изучения и проведения исследований с большей статистической мощностью.

Выводы

Основными факторами, влияющими на показатели общей смерти, смерти вследствие хронической сердечной недостаточности, а также повторной госпитализации, связанной с прогрессированием хронической сердечной недостаточности, явились: уровни циркулирующих эндотелиальных апоптотических микрочастиц и эндотелиальных прогениторных мононуклеаров, соотношение эндотелиальных апоптотических микрочастиц и эндотелиальных прогениторных мононуклеаров, содержание N-терминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида, функциональный класс хронической сердечной недостаточности, фракция выброса левого желудочка, сахарный диабет 2 типа, а также многососудистое поражение коронарных артерий.

У пациентов с хронической сердечной недостаточностью II—IV функциональных классов верхний квартиль значений соотношения эндотелиальных апоптотических микрочастиц и эндотелиальных прогениторных мононуклеаров по сравнению с нижними квартилями ассоциируется с повышением риска возникновения общей смерти, смерти вследствие хронической сердечной недостаточности и повторной госпитализации, вызванной прогрессированием хронической сердечной недостаточности.

Соотношение эндотелиальных апоптотических микрочастиц и эндотелиальных прогениторных мононуклеаров сохраняет свой прогностический потенциал как независимый фактор риска возникновения неблагоприятных клинических исходов, тогда как добавление в прогностическую модель

таких факторів, як рівень N-термінального фрагмента мозгового натрийуретического пептида, функціональний клас хронічної серцевої недостаточності, фракція виброса левого желудочка, наличие сахарного діабета 2 типу и

многосудистого поражения коронарных артерий, не способствует повышению дискриминационной значимости соотношения эндотелиальных апоптотических микрочастиц и эндотелиальных прогениторных мононуклеаров.

Література

- Adams V, Lenk K, Linke A. et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 684–690.
- Alba A.C., Lalonde S.D., Rao V. et al. Circulating Proangiogenic Progenitor Cells Independently Predict Functional Capacity in Heart Failure Patients // *Can. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 29 (6). – P. 664–671.
- Banerjee S., Brilakis E., Zhang S. et al. Endothelial progenitor cell mobilization after percutaneous coronary intervention // *Atherosclerosis.* – 2006. – Vol. 189 (1). – P. 70–75.
- Barteneva N.S., Fasler-Kan E., Bernimoulin M. et al. Circulating microparticles: square the circle // *BMC Cell Biol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 23.
- Berezin A. E., Kremzer A. A. Analysis of Various Subsets of Circulating Mononuclear Cells in Asymptomatic Coronary Artery Disease // *J. Clin. Med.* – 2013. – Vol. 2. – P. 32–44.
- Bozdogan-Turan I., Turan R.G., Paranskaya L. et al. Correlation between the functional impairment of bone marrow-derived circulating progenitor cells and the extend of coronary artery disease // *J. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 10. – P. 143.
- Budaj M., Poljak Z., Đuriš I. et al. Microparticles: a component of various diseases // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2012. – Vol. 122 (suppl. 1). – P. 24–29.
- Camussi G., Deregibus M. C., Bruno S. et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication // *Kidney Int.* – 2010. – Vol. 78 (9). – P. 838–848.
- Fadini G. P., Maruyama S., Ozaki T. et al. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: a pooled analysis // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5. – P. e11488.
- Geft D., Schwartzberg S., George J. Circulating endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders // *Exp. Rev. Cardiovasc. Ther.* – 2008. – Vol. 6 (8). – P. 1115–1121.
- Hill J. M., Zalos G., Halcox J. P. et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348. – P. 593–600.
- Hirschi K. K., Ingram D. A., Yoder M. C. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28, N9. – P. 1584–1595.
- Horstman L. L., Jy W., Jimenez J. J., Ahn Y. S. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction // *Front. Biosci.* – 2004. – Vol. 9. – P. 1118–1135.
- Hristov M., Erl W., Linder S., Weber P. C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro // *Blood.* – 2004. – Vol. 104. – P. 2761–2766.
- Hsu C. Y., Huang P. H., Chiang C. H. et al. Increased circulating endothelial apoptotic microparticle to endothelial progenitor cell ratio is associated with subsequent decline in glomerular filtration rate in hypertensive patients // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8 (7). – P. e68644.
- Huang P. H., Huang S. S., Chen Y. H. et al. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria // *J. Hypertens.* – 2010. – Vol. 28. – P. 1655–1665.
- Jesel L., Abbas M., Toti F. et al. Microparticles in atrial fibrillation: a link between cell activation or apoptosis, tissue remodelling and thrombogenicity // *Int. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 168 (2). – P. 660–669.
- Lacroix R., Judicone C., Mooberry M. et al., The ISTH SSC Workshop. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop // *J. Thromb. Haemost.* – 2013. – Doi: 10.1111/jth.12207. [Epub ahead of print].
- Levey A. S., Stevens L. A., Schmid C. H. et al. for the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate // *Ann. Intern. Med.* – 2009. – Vol. 150 (9). – P. 604–612.
- Lovren F., Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction // *Clin. Chem.* – 2013. – Vol. 59 (8). – P. 1166–1174.
- Mallat Z., Benamer H., Hugel B. et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes // *Circulation.* – 2000. – Vol. 101. – P. 841–843.
- Matsuzawa Y., Sugiyama S., Sumida H. et al. Peripheral endothelial function and cardiovascular events in high-risk patients // *J. Am. Heart Assoc.* – 2013. – Vol. 2 (6). – P. e000426.
- McMurray J. J. V., Adamopoulos S., Anker S. D. et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33. – P. 1787–1847
- Montoro-García S., Shantsila E., Tapp L. D. et al. Small-size circulating microparticles in acute coronary syndromes: relevance to fibrinolytic status, reparative markers and outcomes // *Atherosclerosis.* – 2013. – Vol. 227 (2). – P. 313–322.
- Mullier F., Bailly N., Chatelain C. et al. Pre-analytical issues in the measurement of circulating microparticles: current recommendations and pending questions // *J. Thromb. Haemost.* – 2013. – Vol. 11 (4). – P. 693–696.
- Norling L. V., Dalli J. Microparticles are novel effectors of immunity // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 13 (4). – P. 570–575.
- Ohtsuka M., Sasaki K., Ueno T. et al. Platelet-derived microparticles augment the adhesion and neovascularization capacities of circulating angiogenic cells obtained from atherosclerotic patients // *Atherosclerosis.* – 2013. – Vol. 227 (2). – P. 275–282.
- Pellerin D., Sharma R., Elliott P., Veyrat C. Tissue Doppler, strain, and strain rate echocardiography for the assessment of left and right systolic ventricular function // *Heart.* – 2003. – Vol. 89 (90003). – P. 9–17.
- Pirro M., Schillaci G., Paltriccia R. et al. Increased ratio of CD31+/CD422 microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2530–2535.
- Roger V. L. The Heart Failure Epidemic // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2010. – Vol. 7 (4). – P. 1807–1830.
- Schiller N. B., Shah P. M., Crawford M. et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms // *J. Am. Soc. Echocardiogr.* – 1989. – Vol. 2. – P. 358–367.
- Schmidt-Lucke C., Rossig L., Fichtlscherer S. et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111 (22). – P. 2981–2987.
- Singh N., Van Craeyveld E., Tjwa M. et al. Circulating apoptotic endothelial cells and apoptotic endothelial microparticles independently predict the presence of cardiac allograft vasculopathy // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2012. – Vol. 60 (4). – P. 324–331.
- Sinning J. M., Losch J., Walenta K. et al. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes // *Eur. Heart J.* – 2011. – Vol. 32. – P. 2034–2041.
- Tung J. W., Parks D. R., Moore W. A. et al. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data // *Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 110 (3). – P. 277–283.

Прогностичне значення співвідношення кількості циркулюючих ендотеліальних апоптотичних мікрочастинок та прогеніторних проангіогенних мононуклеарів у пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю

О. Є. Березін, О. О. Кремзер, Т. О. Самура, Ю. В. Мартовицька

Запорізький державний медичний університет

Мета роботи — оцінити прогностичне значення співвідношення циркулюючих ендотеліальних апоптотичних мікрочастинок (ЕАМ) та ендотеліальних прогеніторних мононуклеарів (ЕПМ) для кумулятивної виживаності у хворих із хронічною серцевою недостатністю (ХСН).

Матеріали і методи. У дослідження залучено 154 хворих із ХСН II–IV функціональних класів (ФК). Фенотипування популяції ЕАМ і мононуклеарних клітин здійснювалося методом проточної цитофлуориметрії.

Результати та обговорення. Медіана відношення ЕАМ/ЕПМ у пацієнтів, що вижили, і померлих склала 0,84 (95% ДІ 7,6–9,2) і 78,9 (95% ДІ 53,0–116,6) відповідно ($p = 0,001$). Для подальшого аналізу відношення ЕАМ/ЕПМ було представлено у вигляді кватилів Q1 (Me = 9,7; 95% ДІ 5,8–10,6); Q2 (Me = 18,2; 95% ДІ 11,0–22,2); Q3 (Me = 41,4; 95% ДІ 22,5–57,8); Q4 (Me = 73,0; 95% ДІ 58,9–96,6). Використовуючи метод оцінки виживання Каплана – Мейера, виявили істотну розбіжність кривих виживання для пацієнтів із четвертим кватилем (Q4) відношення ЕАМ/ЕПМ порівняно з хворими, для яких величина останнього відповідала нижчим кватилям (Q1–Q3).

Висновки. У пацієнтів з ХСН II–IV ФК верхній кватиль значень відношення ЕАМ/ЕПМ порівняно з нижніми кватилями асоціюється з підвищенням ризику виникнення загальної смерті, смерті внаслідок ХСН і повторної госпіталізації, викликані прогресуванням ХСН.

Ключові слова: ендотеліальні апоптотичні мікрочастинки, проангіогенні мононуклеарні клітини, хронічна серцева недостатність, виживаність, госпіталізація, прогноз.

Predictive value of circulating apoptotic microparticles to mononuclear proangiogenic progenitor cells ratio in patients with chronic heart failure

A. E. Berezin, A. A. Kremzer, T. A. Samura, Yu. V. Martovitskaya

Zaporizhzhia State Medical University

Purpose — to evaluate the predictive value of circulating endothelial-derived apoptotic microparticles (EAMPs) to proangiogenic mononuclear cells (PMCs) ratio for cumulative survival in patients with chronic heart failure (CHF).

Materials and methods. A total of 154 patients with CHF of II – IV functional class were enrolled in the study. Flow cytometry analysis for quantifying the number of EAMPs and proangiogenic PMCs was used.

Results and discussion. Calculated EAMPs to PMCs ratios in patients that survived and died were 8.4 (95% CI = (7.6–9.2) and 78.9 (95% CI 53.0–116.6), respectively, ($p = 0.001$). For further analysis the values of EAMPs to PMCs ratio for entire patient population included in the study were presented by quartiles (Q): Q1 (median = 9.7; 95% CI = 5.8–10.6); Q2 (median = 18.2; 95% CI 11.0–22.2); Q3 (median = 41.4; 95% CI 22.5–57.8); Q4 (median = 73.0; 95% CI 58.9–96.6). Using Kaplan – Meier survival analysis we have found a significant divergence of survival curves in patients with top quartile (Q4) of EAMPs to PMCs ratio as compared to those with low quartiles (Q1–Q3).

Conclusions. In patients with CHF of II–IV FC, top quartile values of EAMPs to PMCs ratio compared with low quartile values are associated with increased risk of all-cause mortality, CHF-related death and risk for recurrent hospitalization due to CHF.

Key words: endothelial-derived apoptotic microparticles, proangiogenic mononuclear cells, chronic heart failure, survival, hospitalization, prognosis.