

Прогностическое значение различных фенотипов циркулирующих эндотелиальных микрочастиц у пациентов с хронической сердечной недостаточностью: результаты проспективного исследования



А. Е. Березин, А. А. Кремзер, Т. А. Самура

Запорожский государственный медицинский университет

Цель работы — изучить прогностическое значение циркулирующих эндотелиальных микрочастиц с апоптотическим и неапоптотическим фенотипами у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) при длительном наблюдении.

Материалы и методы. В исследовании проспективным методом оценено общее количество фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых событий в когорте 388 пациентов с ХСН на протяжении трех лет наблюдения. Уровни циркулирующего N-терминального мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP), высокочувствительного С-реактивного протеина (С-РП), эндотелиальных микрочастиц (ЭМЧ) были оценены однократно в начале исследования.

Результаты и обсуждение. Медиана продолжительности исследования — 2,32 года (межквартильный интервал — 1,8—3,1 года). На протяжении всего периода наблюдения идентифицировано 110 сердечно-сосудистых событий (включая 43 фатальных случая). Кроме того, 74 пациента были госпитализированы повторно вследствие прогрессирования ХСН, а для 16 больных причиной urgentной госпитализации явились иные кардиоваскулярные события. Унивариантный логистический регрессионный анализ показал, что основными факторами, влияющими на кумулятивную частоту возникновения клинических исходов, были уровни креатинина, глюкозы натощак, гликозилированного гемоглобина, общего холестерина, мочевой кислоты в крови, NT-proBNP, высокочувствительного С-РП, различные фенотипы ЭМЧ, класс ХСН по NYHA, снижение фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) ниже 45 %, сахарный диабет 2 типа. В мультивариантной регрессионной модели установлено, что только функциональный класс ХСН, ФВ ЛЖ менее 45 %, уровни NT-proBNP, высокочувствительный С-РП, ЭМЧ с фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ явились независимыми предикторами клинических исходов. При этом добавление ЭМЧ с фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ к стандартной прогностической модели улучшало общий дискриминантный потенциал для кумулятивных событий на 11,4 и 10,5 % соответственно.

Выводы. Апоптотический фенотип циркулирующих эндотелиальных микрочастиц, представленный как CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺, у пациентов с ХСН обладает высокой прогностической ценностью для кумулятивной трехлетней частоты сердечно-сосудистых событий. Идентификация апоптотического фенотипа как преобладающего паттерна циркулирующих эндотелиальных микрочастиц, вероятно, может быть предложена как перспективный метод для последующей дополнительной стратификации пациентов с ХСН в группу высокого сердечно-сосудистого риска.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, микрочастицы, предсказуемая ценность, сердечно-сосудистые исходы.

Стаття надійшла до редакції 26 січня 2015 р.

Березін Олександр Євгенович, д. мед. н., проф. кафедри
69000, м. Запоріжжя, просп. Маяковського, 26

© О. Е. Березін, О. О. Кремзер, Т. О. Самура, 2015

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) — одна из основных причин сердечно-сосудистой смертности [17, 32]. Уже на ранних ее стадиях проявляются признаки эндотелиальной дисфункции [1, 19]. Но несмотря на то, что эндотелий является важной мишенью для многих кардиоваскулярных факторов риска [11, 34], механизмы влияния дисфункции эндотелия на формирование и прогрессирование ХСН изучены не достаточно. Провоспалительную и нейрогуморальную активацию, а также метаболические коморбидные состояния сегодня также рассматривают в контексте значимости дисфункции эндотелия в процессе формирования ХСН [34]. К настоящему времени разработаны и внедрены различные методы идентификации дисфункции эндотелия с помощью биологических маркеров (симметричный и несимметричный L-аргинин, тромбоспондин, адгезивные молекулы, остеокальцин, остеокальцин и т.п.), обладающих достаточно приемлемым прогностическим потенциалом при ХСН [8, 26, 30]. Наряду с большим количеством явных преимуществ последние имеют и ряд существенных недостатков (высокая биологическая вариабельность, зависимость циркулирующего уровня маркера от возраста, пола, состояния функции почек, коморбидных заболеваний, высокая стоимость, низкая воспроизводимость), негативным образом отражающихся на интерпретации полученных данных и стратификации пациентов в группу высокого риска [10]. Все это создает основу для поиска более информативных биологических маркеров, в том числе и дисфункции эндотелия, с меньшим количеством недостатков.

Принимая во внимание патогенез ХСН и роль сосудистого эндотелия в развитии миокардиальной дисфункции, эндотелиальные микрочастицы (ЭМЧ) различного происхождения, высвобождаемые при сосудистом повреждении или активации эндотелиоцитов, рассматриваются как индикаторы тяжести дисфункции эндотелия и новый прогностический биологический маркер при ХСН [2, 21]. ЭМЧ представляют собой гетерогенную популяцию микровезикул (диаметр 100–1000 нм), которая формируется из остатков клеточных мембран эндотелиоцитов, сохраняя поверхностно экспрессированные рецепторы, регуляторные протеины, молекулы межклеточной адгезии, ионные каналы, свойственные материнским клеткам [13]. ЭМЧ обычно секретируются активированными или апоптотическими эндотелиоцитами в ответ на специфические и неспецифические стимулы и играют важную роль в процессах васкулогенеза, воспаления, тканевого повреждения и репарации, коагуляции, межклеточного взаимодействия [29]. ЭМЧ часто рассматривают как транспортную форму для регуляторных пептидов, активных протеинов, сигнальных молекул, микро-РНК, гормонов, факторов коа-

гуляции и т. п. [3]. Вместе с тем, роль различных фенотипов циркулирующих ЭМЧ у пациентов с ХСН остается не вполне изученной [5].

Цель работы — изучить прогностическое значение циркулирующих эндотелиальных микрочастиц с апоптотическим и неапоптотическим фенотипами у пациентов с хронической сердечной недостаточностью при трехлетнем наблюдении.

Материалы и методы

В исследование включено 388 пациентов с ХСН, соответствующих критериям включения: возраст старше 18 лет, доказанная ишемическая природа ХСН, согласие на участие в исследовании и отсутствие критериев исключения. В качестве последних использовались: инфаркт миокарда с зубцом Q или нестабильная стенокардия на протяжении 30 сут до включения в исследование, стенокардия напряжения IV ФК, неконтролируемая артериальная гипертензия (АГ), тяжелое течение сахарного диабета (СД) или необходимость в проведении инсулинотерапии, тяжелые заболевания печени и почек, онкологические заболевания, симптоматическая АГ, инфекционное заболевание в течение 3 нед до скринирования, перенесенный мозговой инсульт, черепно-мозговая травма в течение 3 мес; стенозы коронарных артерий, требующие немедленного проведения аортокоронарного шунтирования или чрескожного вмешательства; уровень креатинина плазмы крови более 440 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) менее 35 мл/(мин · 1,73 м²), а также любые другие нарушения, которые, по мнению исследователей, могли препятствовать участию пациентов в исследовании.

Проспективным методом изучена кумулятивная частота выявления фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых событий на протяжении 3 лет наблюдения.

Исследование одобрено Комиссией по этике при Запорожском государственном медицинском университете. Все пациенты дали добровольное письменное согласие на участие в испытании.

Ишемическую природу ХСН устанавливали в случае ее непосредственной связи с ранее документированным инфарктом миокарда или при позитивном результате рентгеноконтрастной мультиспиральной компьютерной томографии-ангиографии (n = 63) [6] и/или ангиографического исследования коронарных артерий (n = 84).

Показатели систолической и диастолической функции оценивали с помощью трансторакальной эхокардиографии по общепринятому методу на аппарате Acuson (Siemens, Германия) в В-режиме эхолокации [33]. Величину фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) рассчитывали по методу Симпсона. Интер- и интрааналитическая

вариабельность для ФВ ЛЖ составляла 3,2 и 1,1 % соответственно.

СКФ рассчитывали по формуле СКД-ЕРІ [16].

Образцы крови в количестве 10 мл отбирали в ранние утренние часы (7:00—8:00) в начале исследования. Все полученные образцы подвергались обработке в соответствии с рекомендациями к аналитическим исследованиям, предоставляемыми производителями лабораторных наборов. Содержание N-терминального фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) измеряли иммуноэлектрохемилюминесцентным методом с использованием наборов фирмы R&D Systems (США) на анализаторе Elecsys 1010 (Roche, Германия). Концентрацию высокочувствительного С-реактивного протеина (С-РП) в образцах крови измеряли нефелометрическим методом на аппарате AU640 Analyzer (Olympus Diagnostic Systems Group, Япония). Концентрацию общего холестерина (ХС) и ХС липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) измеряли ферментативным методом. Содержание ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) рассчитывали по формуле W. T. Friedewald (1972) [12].

Фенотипирование популяций ЭМЧ 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 (platelet endothelial cell adhesion molecule [PECAM]-1), CD144 (васкулярный эндотелиальный кадгерин), CD62E (E-селектин) и аннексин V [annexin-V] (BD Biosciences, США) 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). Все образцы предварительно инкубировались в темноте на протяжении 15 мин при комнатной температуре в соответствии с инструкциями производителя лабораторных наборов. Для идентификации annexin V⁺ ЭМЧ добавляли 400 мкл annexin-V связывающего буфера. Все образцы анализировали на цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter). Для каждой из проб учитывали 500 тыс. событий. При анализе скатерограмм ЭМЧ с фенотипом CD31⁺/annexin V⁺, CD144⁺/CD31⁺ и CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ идентифицировались как апоптотические микрочастицы. При этом ЭМЧ с фенотипом CD62E⁺ были определены как микрочастицы, высвобождаемые вследствие активации эндотелиоцитов [14, 27].

Статистический анализ полученных данных проведен с помощью программ SPSS system for Windows, Version 22 (SPSS Inc, США) и GraphPad Prism for Windows, Version 5 (GraphPad Software Inc, США). После оценки центральной тенденции

все номинальные данные представляли как средние значения и стандартное отклонение или 95 % доверительный интервал (ДИ) для дисперсий с нормальным распределением или как медиана и межквартильный интервал для дисперсий с ненормальным распределением. Категориальные данные представлены как количество и частота случаев. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп применяли парный критерий Стьюдента. Сравнения категориальных переменных между группами проводили с использованием χ^2 теста и точного критерия Фишера F. Потенциальные факторы, которые могли бы быть связаны с изменением клинических исходов, изучены в унивариантном и мультивариантном регрессионном анализе. Отношение шансов (ОШ) и 95 % ДИ рассчитаны для всех независимых предикторов возникновения суммарных сердечно-сосудистых событий. Процедура реклассификации (C-statistics) с расчетом индексов IDI (Integrated Discrimination Improvement) и NRI (Net Reclassification Improvement) проведена для отобранных независимых предикторов отдаленного прогноза. Результаты считали достоверными при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Основная характеристика пациентов, принявших участие в исследовании, представлена в табл. 1. Все пациенты были распределены на две группы в зависимости от наличия (1-я группа, $n = 110$) или отсутствия (2-я группа, $n = 278$) документированных сердечно-сосудистых событий на протяжении периода наблюдения. Обращает на себя внимание, что среди пациентов 2-й группы достоверно чаще встречались ХСН III—IV ФК, сниженная СКФ, повышенные уровни креатинина, NT-proBNP, высокочувствительного С-РП и общего ХС.

Большинство пациентов с ХСН получали терапию ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), блокаторами рецепторов ангиотензина II (БРА-II), β -адреноблокаторами, антагонистами минералокортикоидных рецепторов, диуретиками, а также ивабрадином и антиагрегантами. Дигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов назначали пациентам с сопутствующей АГ при необходимости достижения целевого уровня артериального давления (АД). Метформин и ситаглиптин назначали пациентам с СД 2 типа. Петлевые диуретики и ацетилсалициловую кислоту назначали достоверно чаще пациентам 1-й группы, тогда как частота использования β -адреноблокаторов, статинов и ситаглиптина была выше у больших 2-й группы.

Медиана продолжительности исследования составила 2,32 года (межквартильный интервал — 1,8—3,1 года). За этот период удалось идентифици-

Т а б л и ц а 1

Клиническая характеристика пациентов, участвующих в исследовании

Показатель	1-я группа (n = 110)	2-я группа (n = 278)	Все больные (n = 388)	p
Возраст, годы	57,3 ± 6,2	58,7 ± 7,2	58,3 ± 9,6	0,86
Мужчины	64 (58,2%)	143 (51,4%)	207 (53,3%)	0,88
ХСН I ФК по NYHA	–	77 (27,7%)	77 (19,8%)	0,001
ХСН II ФК по NYHA	26 (23,6%)	121 (43,5%)	147 (37,9%)	0,001
ХСН III ФК по NYHA	52 (47,3%)	31 (11,2%)	83 (21,4%)	0,001
ХСН IV ФК по NYHA	32 (29,1%)	49 (17,6%)	81 (20,9%)	0,001
АГ	62 (56,4%)	152 (54,7%)	214 (55,5%)	0,96
Дислипидемия	48 (43,6%)	208 (74,8%)	256 (66,0%)	0,024
СД 2 типа	42 (38,2%)	104 (37,4%)	146 (37,6%)	0,94
Ожирение	54 (49,1%)	118 (42,4%)	172 (44,3%)	0,82
Приверженность к курению	25 (22,7%)	51 (18,3%)	76 (19,6%)	0,77
Индекс массы тела, кг/м ²	23,9 (20,7–25,9)	23,3 (21,5–24,8)	24,1 (21,6–28,7)	0,68
Систолическое АД, мм рт. ст.	130 ± 5	133 ± 5	131 ± 8	0,84
Диастолическое АД, мм рт. ст.	77 ± 4	78 ± 4	78 ± 5	0,92
ЧСС в 1 мин	74,60 ± 4,6	69,10 ± 6,2	70,52 ± 3,34	0,48
ФВ ЛЖ, %	42,20 ± 3,11	43,20 ± 6,18	42,80 ± 5,76	0,76
СКФ, мл/(мин · 1,73 м ²)	81,5 (71,3–94,7)	83,9 (77,1–102,6)	82,3 (68,7–102,6)	0,055
Креатинин, мкмоль/л	73,1 (60,9–80,5)	70,7 (59,1–88,1)	72,3 (58,7–92,6)	0,048
Глюкоза натощак, ммоль/л	5,27 (3,5–9,4)	4,98 (3,8–8,1)	5,20 (3,3–9,7)	0,28
HbA _{1c} , %	6,9 (4,3–9,2)	6,6 (4,6–8,3)	6,8 (4,1–9,5)	0,36
Общий ХС, ммоль/л	5,3 (4,6–6,0)	5,0 (3,5–5,9)	5,1 (3,9–6,1)	0,047
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,96 (0,93–1,05)	0,88 (0,84–1,01)	0,91 (0,89–1,12)	0,044
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,71 (3,50–4,20)	3,53 (3,11–3,97)	3,23 (3,11–4,40)	0,06
NT-proBNP, пг/мл	2616,5 (1085,3–3683,5)	1530,6 (644,5–2560,6)	1977,2 (984,7–2993,2)	0,042
Высокочувствительный С-РП, мг/л	8,04 (6,81–9,52)	6,96 (5,03–8,13)	7,34 (6,77–7,95)	0,036

NYHA – New York Heart Association, HbA_{1c} – гликозилированный гемоглобин.

Категориальные переменные представлены как количество случаев и удельный вес, количественные – как среднее и стандартное отклонение или медиана и 95% ДИ.

Т а б л и ц а 2

Сопутствующая терапия у пациентов с ХСН, включенных в исследование

Препарат	1-я группа (n = 110)	2-я группа (n = 278)	Все больные (n = 388)	p
Ингибиторы АПФ или БРА-II	110 (100%)	278 (100%)	388 (100%)	1,0
Бета-адреноблокаторы	73 (66,4%)	251 (90,3%)	324 (83,5%)	0,001
Антагонисты минералокортикоидных рецепторов	45 (40,9%)	107 (38,5%)	152 (39,2%)	0,66
Петлевые диуретики	110 (100%)	201 (72,3%)	311 (80,1%)	0,043
Ивабрадин	43 (39,0%)	94 (33,8%)	137 (35,3%)	0,78
Дигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов	17 (15,5%)	46 (16,5%)	63 (16,2%)	0,88
Ацетилсалициловая кислота	96 (87,3%)	209 (75,2%)	305 (78,6%)	0,022
Другие антиагреганты	14 (12,7%)	69 (24,8%)	83 (21,4%)	0,026
Статины	48 (43,6%)	246 (88,5%)	294 (75,7%)	0,012
Метформин	42 (38,2%)	104 (37,4%)	146 (37,6%)	0,86
Ситаглиптин	9 (8,2%)	40 (14,4%)	48 (12,4%)	0,001

Т а б л и ц а 3

Наиболее важные факторы, ассоциированные с кумулятивными кардиоваскулярными исходами у больных с ХСН. Результаты унивариантного и мультивариантного регрессионного анализа

Вариансы	Унивариантный анализ			Мультивариантный анализ		
	ОШ	95 % ДИ	р	ОШ	95 % ДИ	р
ФК ХСН	1,15	1,03–1,29	0,006	1,06	1,01–1,09	0,001
ФВ ЛЖ менее 45 %	1,56	1,23–1,72	0,002	1,17	1,04–1,25	0,003
NT-proBNP на каждые 400 пг/мл	1,97	1,25–3,06	0,001	1,37	1,08–2,10	0,001
Высокочувствительный С-РП на каждый 1 мг/л	1,32	1,22–1,57	0,001	1,12	1,03–1,25	0,001
Креатинин на каждые 45 мкмоль/л	1,07	1,02–1,10	0,003	1,03	0,88–1,06	0,12
HbA _{1c} на каждый 1 %	1,05	1,01–1,07	0,002	1,03	0,98–1,05	0,052
СД 2 типа (наличие против отсутствия)	1,05	1,01–1,09	0,006	1,03	0,89–1,07	0,001
ХС ЛПНП на каждые 0,65 ммоль/л	1,04	1,01–1,06	0,001	1,03	1,00–1,05	0,24
ЭМЧ CD144 ⁺ /annexin V ⁺ на каждые 0,3/мл	1,02	1,00–1,04	0,001	0,96	0,89–1,10	0,001
ЭМЧ CD144 ⁺ /CD31 ⁺ на каждые 0,5/мл	1,04	1,02–1,06	0,001	1,02	0,94–1,05	0,001
ЭМЧ CD144 ⁺ /CD31 ⁺ /annexin V ⁺ на каждые 0,6/мл	1,34	1,18–1,62	0,006	1,19	1,12–1,33	0,001
ЭМЧ CD31 ⁺ /annexin V ⁺ на каждые 0,2/мл	1,18	1,10–1,27	0,001	1,07	1,02–1,13	0,001
ЭМЧ CD62E ⁺ на каждые 0,15/мл	1,03	1,00–1,08	0,001	0,99	0,94–1,05	0,001

ровать 110 сердечно-сосудистых событий, включая 43 фатальных. Смертельный исход 35 пациентов оказался непосредственно связан с прогрессированием ХСН, а 8 смертельных событий наступили вследствие иных причин, как то фатальный инфаркт миокарда и тромбоэмболия легочной артерии. Кроме того, 74 пациента были госпитализированы повторно с прогрессированием ХСН, а госпитализация 16 больных была связана с иными сердечно-сосудистыми причинами.

Общее количество ЭМЧ с фенотипом CD144⁺/annexin V⁺ существенно не отличалось у пациентов 1-й и 2-й групп (p=0,22; рисунок). При этом у пациентов 1-й группы концентрация ЭМЧ с фенотипами CD144⁺/CD31⁺, CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ была достоверно выше, чем у больных 2-й группы (p=0,001 для всех слу-

чаев). Напротив, концентрация ЭМЧ CD62E⁺, высвобождаемых при активации эндотелиоцитов, в группах больных достоверно не различалась (p=0,46) (см. рисунок).

Количество циркулирующих ЭМЧ с фенотипом CD144⁺/annexin V⁺ ассоциировалось с ФК ХСН (r=0,41; p=0,002), NT-proBNP (r=0,31; p=0,001), ФВ ЛЖ (r=-0,26; p=0,001). Уровень циркулирующих ЭМЧ с фенотипом CD144⁺/CD31⁺ позитивно ассоциировался с ФК ХСН (r=0,52; p=0,001), NT-proBNP (r=0,44; p=0,003), высокочувствительным С-РП (r=0,33; p=0,001), СД 2 типа (r=0,32; p=0,003) и негативно — с ФВ ЛЖ (r=-0,32; p=0,001), ХС ЛПВП (r=-0,221; p=0,002). Получена тесная ассоциация между концентрацией ЭМЧ CD31⁺/annexin V⁺ с ФК ХСН (r=0,73; p=0,001), NT-proBNP (r=0,689; p=0,001), высо-

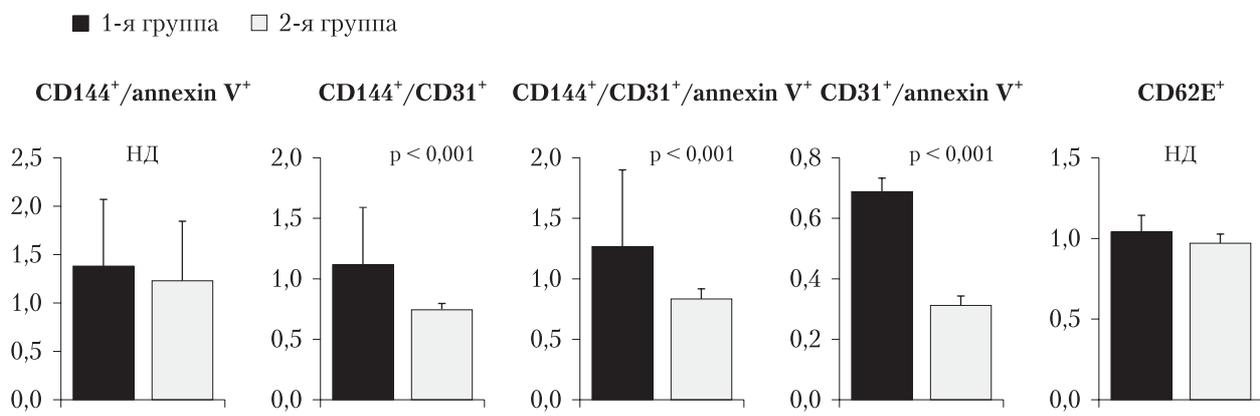


Рисунок. Сравнение профиля циркулирующих ЭМЧ в группах пациентов с ХСН с документированными сердечно-сосудистыми событиями (1-я группа) и без таковых (2-я группа), ЭМЧ/мл

кочувствительным С-РП ($r=0,408$; $p=0,006$), СД 2 типа ($r=0,402$; $p=0,003$), ФВ ЛЖ ($r=-0,496$; $p=0,001$). Содержание ЭМЧ CD62E⁺ ассоциировалось с высокочувствительным С-РП ($r=0,302$; $p=0,001$) и ХС ЛПВП ($r=-0,26$; $p=0,001$). Не выявлено взаимосвязи между уровнем циркулирующих ЭМЧ различных фенотипов с одной стороны и HbA_{1c}, уровнем глюкозы натощак, АД и сопутствующей терапией — с другой.

Идентификация предикторов повышенного возникновения кумулятивных клинических сердечно-сосудистых событий у пациентов с ХСН проведена с помощью уни- и мультивариантного регрессионного анализа. Полученные данные показали, что наиболее важными факторами, ассоциированными с кумулятивными кардиоваскулярными исходами, были уровень циркулирующего NT-proBNP, высокочувствительного С-РП, креатинина, глюкозы натощак, HbA_{1c}, ХС ЛПНП, различные фенотипы ЭМЧ, ФК ХСН, величина ФВ ЛЖ менее 45 % и СД 2 типа. В мультивариантной модели только ФК ХСН, ФВ ЛЖ менее 45 %, NT-proBNP, высокочувствительный С-РП, уровень циркулирующих ЭМЧ с фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ сохранили независимый предикторный потенциал в отношении прогноза больных с ХСН.

Вклад повышения уровня циркулирующих ЭМЧ с фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ в стандартную прогностическую модель, основанную на традиционных факторах риска, включающих в себя ФК ХСН, снижение ФВ ЛЖ менее 45 %, увеличение содержания NT-proBNP и высокочувствительного С-РП, был оценен с помощью реклассификационной процедуры (С-статистика). Анализ полученных данных показал, что добавление ЭМЧ CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и ЭМЧ CD31⁺/annexin V⁺ к стандартной прогностической модели позволяет улучшить величину относительного IDI для кумулятивных сердечно-сосудистых событий на 11,4 и 10,5 % соответственно. Кроме того, добавление ЭМЧ CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ позволяет дополнительно реклассифицировать 5 % сердечно-сосудистых событий как истинно позитивных ($p=0,003$) и 6 % — как истинно негативных ($p=0,001$). Способность ЭМЧ с фенотипом CD31⁺/annexin V⁺ улучшать стандартную ABC-модель выглядит несколько скромнее. Так, добавление ЭМЧ CD31⁺/annexin V⁺ позволяет дополнительно реклассифицировать соответственно 3 и 4 % событий ($p=0,001$ для всех случаев) для категории free-NRI, а также 6 и 7 % не случившихся событий ($p=0,001$ для всех случаев). Таким образом, апоптотический фенотип циркулирующих ЭМЧ может ассоциироваться с частотой кумулятивных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ХСН при трехлетнем наблюдении.

Обсуждение

Настоящее исследование продемонстрировало ассоциацию уровня циркулирующих ЭМЧ с клиническими исходами у пациентов с ХСН. Вместе с тем, профиль ЭМЧ у больных с ХСН может существенным образом отличаться. Апоптотический профиль ЭМЧ представлен циркулирующими микрочастицами с фенотипами CD144⁺/annexin V⁺; CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺. Среди последних ЭМЧ CD144⁺/annexin V⁺ являются низкоспецифичными для программируемой клеточной смерти, а CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ демонстрируют тесную ассоциацию с интенсивностью апоптоза эндотелиоцитов [9]. Циркулирующие ЭМЧ, идентифицированные как микрочастицы CD62E⁺, представляют собой паттерн микровезикул, секретирующихся в результате активации эндотелиоцитов в ответ на неспецифические стимулы (напряжение сдвига на эндотелии, повышение сосудистого тонуса), повреждение или провоспалительную активацию [7]. При этом количество циркулирующих апоптотических ЭМЧ в группе пациентов с зарегистрированными сердечно-сосудистыми событиями было достоверно и значительно повышено, тогда как уровень микрочастиц CD62E⁺ в обеих группах пациентов носил сопоставимый характер. Таким образом, несмотря на то, что нейрогуморальная и провоспалительная активация в значительной мере опосредует секрецию ЭМЧ активированными эндотелиоцитами, именно апоптотический паттерн ЭМЧ проявляет наибольшую прогностическую ценность в отношении кумулятивных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных с ХСН. Действительно, результатами настоящего исследования установлено, что только ФК ХСН, ФВ ЛЖ менее 45 %, уровни NT-proBNP, высокочувствительного С-РП, ЭМЧ с фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ явились независимыми предикторами клинических исходов. При этом добавление ЭМЧ с фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺ к стандартной прогностической модели улучшало общий дискриминантный потенциал для кумулятивных событий на 11,4 и 10,5 % соответственно.

Поскольку циркулирующие ЭМЧ, высвобождаемые в результате повреждения эндотелия, рассматриваются как медиаторы воспалительного ответа в сосудистой стенке [25], результаты настоящего исследования подтверждают гипотезу о том, что дисфункция эндотелия может являться центральным механизмом прогрессирования ХСН. Хотя многочисленные исследования позволили установить, что секреция ЭМЧ является следствием двух основных процессов, связанных с активацией или апоптозом эндотелиоцитов [15], роль различных фенотипов микрочастиц эндотелиального происхождения при ХСН остается не вполне

понятной. Как известно, ЭМЧ, секретируемые активированными эндотелиоцитами, играют важную роль в тканевой репарации, неоангиогенезе, неоваскуляризации и межклеточной кооперации [28]. Напротив, ЭМЧ с апоптотическим фенотипом непосредственно участвуют в модулировании васкулярного повреждения, оказывая непосредственное влияние на прокоагулянтный потенциал крови, оксидантный стресс и провоспалительную активацию, адгезию лейкоцитов, и опосредуют дисфункцию эндотелия [18, 22, 24, 31]. Кроме того, ЭМЧ участвуют в межклеточном обмене информацией, который реализуется посредством активации специфических мембран-ассоциированных рецепторов, экспрессированных на поверхности клеток-мишеней [35]. Мы предполагаем, что преимущественно апоптотический фенотип циркулирующих ЭМЧ создает возможность для модификации эндотелиоцитов путем репрограмминга, что приводит к нарушению функции эндотелия, ухудшению течения ХСН и манифестации неблагоприятных клинических событий [36]. Несмотря на то, что преобладание апоптотического фенотипа не является специфичным маркером ХСН и может проявляться при различных метаболических, воспалительных и аутоиммунных заболеваниях [9], механизмы, посредством которых избыточная продукция апоптотических ЭМЧ оказывает негативное влияние на отдаленный прогноз пациентов, точно не известны.

Ранее установлено, что повышение уровня циркулирующих апоптотических ЭМЧ ассоциируется с высоким риском сердечно-сосудистых событий, повторной госпитализации и кардиоваскулярной

смерти [20]. Более того, существуют клинические доказательства существования тесной ассоциации между паттерном ЭМЧ, тяжестью дисфункции эндотелия и сердечно-сосудистым риском [23]. Результаты настоящего исследования демонстрируют возможность использовать уровень циркулирующих апоптотических ЭМЧ как предиктор неблагоприятных клинических событий, имеющих независимый от иных факторов дискриминантный потенциал. Вероятно, апоптотический фенотип циркулирующих ЭМЧ мог бы быть лучшим предиктор, чем традиционные циркулирующие биомаркеры биомеханического стресса или провоспалительной активации у пациентов с ХСН [4]. Однако это предположение нуждается в исследованиях с большей статистической мощностью и размером выборки.

Выводы

Апоптотический фенотип циркулирующих эндотелиальных микрочастиц, представленный как CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ и CD31⁺/annexin V⁺, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью проявляет высокую прогностическую ценность для кумулятивной трехлетней частоты сердечно-сосудистых событий.

Идентификация апоптотического фенотипа как преобладающего паттерна циркулирующих эндотелиальных микрочастиц, вероятно, может быть предложена как перспективный метод для последующей дополнительной стратификации пациентов с хронической сердечной недостаточностью в группу высокого сердечно-сосудистого риска.

Литература

- Alba A. C., Agoritsas T., Jankowski M. et al. Risk prediction models for mortality in ambulatory patients with heart failure: a systematic review // *Circ. Heart Fail.* — 2013. — 6 (5). — P. 881–889.
- Arraud N., Linares R., Tan S. et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration // *J. Thromb. Haemost.* — 2014. — 12 (5). — P. 614–627.
- Berezin A. E. Circulating Microparticles in Heart Failure: Relation to Comorbidities and Aging // *Heart Health Open Access.* — 2014. — 1 (2). — P. 108–113.
- Berezin A. E., Kremzer A. A., Samura T. A., Martovitskaya Y. V. Apoptotic microparticles to progenitor mononuclear cells ratio in heart failure: relevance of clinical status and outcomes. — 2014. — 2 (2). — P. 50–57.
- Berezin A. E., Kremzer A. A., Samura T. A., Martovitskaya Yu. V. Circulating endothelial-derived apoptotic microparticles in the patients with ischemic symptomatic chronic heart failure: relevance of pro-inflammatory activation and outcomes // *Int. Cardiovasc. Res. J.* — 2014. — 8 (3). — P. 116–123.
- Bluemke D. A., Achenbach S., Budoff M. et al. Noninvasive coronary artery imaging: magnetic resonance angiography and multidetector computed tomography angiography: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Cardiovascular Imaging and Intervention of the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and the Councils on Clinical Cardiology and Cardiovascular Disease in the Young // *Circulation.* — 2008. — 118. — P. 586–606.
- Boulanger C. M., Leroyer A. S., Amabile N., Tedgui A. Circulating endothelial microparticles: A new marker of vascular injury // *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris).* — 2008. — 57. — P. 149–154.
- Carrasco-Sánchez F. J., Páez-Rubio M. I. Review of the prognostic value of Galectin-3 in heart failure focusing on clinical utility of repeated testing // *Mol. Diagn. Ther.* — 2014 [Epub ahead of print].
- Chironi G. N., Boulanger C. M., Simon A. et al. Endothelial microparticles in diseases // *Cell Tissue Res.* — 2009. — 335. — P. 143–151.
- De Berardinis B., Januzzi J. L. Jr. Use of biomarkers to guide outpatient therapy of heart failure // *Curr. Opin. Cardiol.* — 2012. — 27 (6). — P. 661–668.

11. Ehrlich J.R., Kaluzny M., Baumann S. et al. Biomarkers of structural remodelling and endothelial dysfunction for prediction of cardiovascular events or death in patients with atrial fibrillation // *Clin. Res. Cardiol.* – 2011. – 100 (11). – P. 1029–1036.
12. Friedewald W.T., Levy R.L., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge // *Clin. Chem.* – 1972. – 18 (6). – P. 499–502.
13. Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M. et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis // *Thromb. Res.* – 2003. – 109. – P. 175–180.
14. 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]
15. Leroyer A.S., Anfosso F., Lacroix R. et al. Endothelial-derived microparticles: biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis // *Thromb. Haemost.* – 2010. – 104. – P. 456–463.
16. 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. – 150 (9). – P. 604–612.
17. Lloyd-Jones D., Adams R.J., Brown T.M. et al. Heart disease and stroke statistics – 2010 update: a report from the American Heart Association // *Circulation.* – 2010. – 121 (7). – P. e46–e215.
18. Loyer X., Vion A.C., Tedgui A., Boulanger C.M. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases // *Circ. Res.* – 2014. – 114 (2). – P. 345–353.
19. Maisel A. Biomonitoring and biomarker-guided therapy: the next step in heart failure and biomarker research // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2011. – 58 (18). – P. 1890–1892.
20. Matsuzawa Y., Sugiyama S., Sumida H. et al. Peripheral endothelial function and cardiovascular events in high-risk patients // *J. Am. Heart Assoc.* – 2013. – 2 (6). – P. e000426.
21. Mause S.F., Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange // *Circ. Res.* – 2010. – 107. – P. 1047–1057.
22. Mezentssev A., Merks R.M., O'Riordan E. et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – 289 (3). – P. H1106–1114.
23. 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. – 227 (2). – P. 313–322.
24. Morel O., Toti F., Freyssinet J.M. Markers of thrombotic disease: procoagulant microparticles // *Ann. Pharm. Fr.* – 2007. – 65 (2). – P. 75–84.
25. Nomura S., Ozaki Y., Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings // *Thromb. Res.* – 2008. – 123. – P. 8–23.
26. Oremus M., Don-Wauchope A., McKelvie R. et al. BNP and NT-proBNP as prognostic markers in persons with chronic stable heart failure // *Heart Fail. Rev.* – 2014 [Epub ahead of print].
27. Orozco A.F., Lewis D.E. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma // *Cytometry A.* – 2010. – 77 (6). – P. 502–514.
28. Pérez-Casal M., Downey C., Cutillas-Moreno B. et al. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects // *Haematologica.* – 2009. – 94. – P. 387–394.
29. Pirro M., Schillaci G., Bagaglia F. et al. Microparticles derived from endothelial progenitor cells in patients at different cardiovascular risk // *Atherosclerosis.* – 2008. – 197 (2). – P. 757–767.
30. Rajendiran K.S., Ananthanarayanan R.H., Satheesh S., Rajappa M. Elevated levels of serum sialic acid and high-sensitivity C-reactive protein: markers of systemic inflammation in patients with chronic heart failure // *Br. J. Biomed. Sci.* – 2014. – 71 (1). – P. 29–32.
31. Sabatier F., Roux V., Anfosso F. et al. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity // *Blood.* – 2002. – 99. – P. 3962–3970.
32. Santulli G. Epidemiology of cardiovascular disease in the 21st century: updated numbers and updated facts // *JCvD.* – 2013. – 1 (1). – P. 1–2.
33. 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. – 2. – P. 358–367.
34. Tschöpe C., Van Linthout S. New insights in (inter)cellular mechanisms by heart failure with preserved ejection fraction // *Curr. Heart Fail. Rep.* – 2014 [Epub ahead of print].
35. Van Wijk M.J., Van Bavel E., Sturk A., Nieuwland R. Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular diseases // *J. Aging Res.* – 2013. – P. 734509.
36. Van Wijk M.J., Van Bavel E., Sturk A., Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – 59 (2). – P. 277–287.

Прогностичне значення різних фенотипів циркулюючих ендотеліальних мікрочастинок у пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю: результати проспективного дослідження

О. Є. Березін, О. О. Кремзер, Т. О. Самура

Запорізький державний медичний університет

Мета роботи – вивчити прогностичне значення циркулюючих ендотеліальних мікрочастинок з апоптотичними і неапоптотичними фенотипами в пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю (ХСН) протягом тривалого спостереження.

Матеріали і методи. У дослідженні проспективним методом оцінено загальну кількість фатальних і нефатальних серцево-судинних подій у когорті 388 пацієнтів з ХСН протягом трьох років спостереження. Рівні циркулюючого N-термінального мозкового натрійуретичного пептиду (NT-proBNP), високочутливого C-реактивного протеїну (С-РП), ендотеліальних мікрочастинок (ЕМЧ) оцінено одноразово на початку дослідження.

Результати та обговорення. Медіана тривалості дослідження – 2,32 року (міжквартильний інтервал – 1,8–3,1 року). Протягом усього періоду спостереження ідентифіковано 110 серцево-судинних подій (з них 43 фатальних випадки). Крім того, 74 пацієнти були госпіталізовані повторно внаслідок прогресування ХСН, а для 16 хворих причиною ургентної госпіталізації стали інші серцево-судинні події. Уніваріантний логістичний регресійний аналіз показав, що основними

чинниками, які впливають на кумулятивну частоту виникнення клінічних результатів, були рівні креатиніну, глюкози натще, глікозильованого гемоглобіну, загального холестерину, сечової кислоти в крові, NT-proBNP, високочутливого С-РП, різні фенотипи ЕМЧ, клас ХСН за NYHA, зниження фракції викиду лівого шлуночка (ФВ ЛШ) менше 45 %, цукровий діабет 2 типу. У мультиваріантній регресійній моделі встановлено, що тільки функціональний клас ХСН, ФВ ЛШ менше 45 %, рівні NT-proBNP, високочутливий С-РП, ЕМЧ з фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ та CD31⁺/annexin V⁺ слугують незалежними предикторами клінічних результатів. Крім того, додавання ЕМЧ з фенотипами CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ і CD31⁺/annexin V⁺ до стандартної прогностичної моделі покращувало загальний дискримінантний потенціал для кумулятивних подій на 11,4 і 10,5 % відповідно.

Висновки. Апоптотичний фенотип циркулюючих ендотеліальних мікрочастинок, представлений у вигляді CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ і CD31⁺/annexin V⁺, у пацієнтів з ХСН має високу прогностичну цінність щодо кумулятивної трирічної частоти серцево-судинних подій. Ідентифікація апоптотичного фенотипу як паттерна циркулюючих ендотеліальних мікрочастинок, що переважає, може бути запропонована як перспективний метод для подальшої додаткової стратифікації пацієнтів з ХСН до групи високого серцево-судинного ризику ризику.

Ключові слова: хронічна серцева недостатність, мікрочастинки, прогностична цінність, серцево-судинні наслідки.

The predictive role of various phenotypes of circulating endothelial-derived microparticles in patients with chronic heart failure: results of prospective study

O. E. Berezin, O. O. Kremzer, T. O. Samura

Zaporizhzhia State Medical University

Purpose — to evaluate whether circulating microparticles with apoptotic or none-apoptotic phenotypes are useful for risk assessment of three-year cumulative fatal and non-fatal cardiovascular events in CHF patients.

Materials and methods. It was studied prospectively the incidence of fatal and non-fatal cardiovascular events, as well as the frequency of occurrence of death from any cause in a cohort of 388 patients with CHF during 3 years of observation. Circulating levels of NT-pro brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), endothelial apoptotic microparticles (EMPs) were measured at baseline.

Results and discussion. Median follow-up was of 2.32 years (IQR = 1.8–3.1). During follow-up, 110 cardiovascular events (including 43 fatal cases) were determined. Additionally, 74 subjects were hospitalized repetitively due to worsening CHF and also 16 subjects were readmitted in the hospital due to other cardiovascular reasons. In the univariate logistic regression analysis, the main factors independently related with cumulative end-points were creatinine, fasting glucose, HbA_{1c}, total cholesterol, uric acid various types of EMPs, NT-pro-BNP, hs-CRP, NYHA class, decreased left ventricular ejection fraction (LVEF) less 45 %, and type 2 diabetes mellitus. In multivariate model NYHA class, decreased LVEF (less 45 %), NT-pro-BNP, hs-CRP, CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ EMPs, and CD31⁺/annexin V⁺ EMPs remained statistically significant for cumulative end-point. Adding of CD144⁺/CD31⁺/annexin V⁺ EMPs and CD31⁺/annexin V⁺ EMPs to the standard ABC model may improve the relative IDI for cumulative end-point by 11.4 % and 10.5 % respectively.

Conclusions. Apoptotic phenotype of circulating microparticles may relate three-year combined clinical outcomes in CHF patients.

Key words: chronic heart failure, microparticles, predictive value, cardiovascular outcomes.