

УЛЫБЫШЕВА АДЭЛЯ АНВЕРОВНА

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГАЛЕКТИНА-3
ПРИ ОСТРОМ ОТТОРЖЕНИИ И ФИБРОЗЕ
ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА**

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
профессор

Шевченко Ольга Павловна

Официальные оппоненты:

Копылов Филипп Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, директор Института персонализированной медицины, профессор кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Метельская Виктория Алексеевна – доктор биологических наук, профессор, руководитель отдела изучения биомаркеров риска хронических неинфекционных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «24» декабря 2019 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.055.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.transpl.ru>.

Автореферат разослан «___»

2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета Д 208.055.01
кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эффективность трансплантации сердца (ТС) как радикального метода лечения пациентов в терминальной стадии застойной сердечной недостаточности доказана большим количеством исследований [Lund L.H., 2014; Готье С.В., 2015; Yusen R.D., 2015].

Несмотря на совершенствование иммуносупрессивной и адьювантной медикаментозной терапии и достигнутый за последние годы значительный прогресс в выживаемости пациентов с трансплантированным сердцем, в отдаленном периоде у реципиентов может развиваться субклиническая сердечная недостаточность (СН), возникающая вследствие совокупности различных патологических механизмов [Готье С.В., 2014]. Одним из ключевых компонентов патогенеза СН является фиброз трансплантата, который формируется вследствие накопления в миокарде фрагментов фибриллярного белка – коллагена I и III типов [Milting H., 2008; Dang Z., 2012; Lok S.I., 2015]. Развитию СН у реципиентов и формированию фибротических изменений в трансплантированном сердце способствуют острое отторжение сердечного трансплантата, артериальная гипертензия, васкулопатия трансплантата, метаболический синдром, сахарный диабет, нарушение функции почек и др. [Hullin R., 2014].

Объективным методом верификации патологии миокарда трансплантированного сердца является эндомиокардиальная биопсия (ЭМБ), выполнение которой сопряжено со всеми ограничениями и рисками инвазивных вмешательств. Разработка малоинвазивных методов выявления осложнений в посттрансплантационном периоде является приоритетной задачей. Одним из путей решения является поиск новых биомаркеров, с одной стороны, участвующих в индуцировании фибротических процессов, с другой – являющихся индикаторами риска нежелательных событий, связанных с их развитием.

Факторами, участвующими в регуляции фиброгенеза, являются С-концевой пропептид проколлагена типа I (PICP), С-концевой телопептид коллагена типа I (C1TP), матриксная металлопротеиназа (ММР-1) и тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ (ТИМР-1) [Драпкина О.М., 2013; Lok S.I., 2015]. Среди известных биомаркеров, концентрация которых в плазме крови пациентов связана с развитием фиброза, – трансформирующий фактор

роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), N-терминальный участок мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) [Patel J.K., 2013; Franekova J., 2015; Mueller T., 2016].

Галектин-3 является недавно описанным биомаркером сердечной недостаточности и риска развития фиброза миокарда у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [Gandhi P.U., 2015; Desmendt V., 2016; French B., 2016], однако роль галектина-3 у реципиентов сердца при развитии посттрансплантационных осложнений не изучена.

Цель исследования

Определить связь уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов с острым отторжением и развитием фиброза миокарда трансплантата и оценить его диагностическую значимость при трансплантации сердца.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать содержание галектина-3 у пациентов с застойной сердечной недостаточностью – потенциальных реципиентов сердца; определить связь концентрации галектина-3 с возрастом, полом и этиологией сердечной недостаточности.

2. Провести анализ динамики уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации.

3. Оценить корреляции уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца с концентрацией биомаркеров, потенциально значимых при развитии посттрансплантационных осложнений.

4. Определить связь величины уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов с количеством перенесенных кризов острого отторжения трансплантата, верифицированного по результатам гистологического и иммуногистохимического исследования эндомикардиальных биоптатов.

5. Провести сравнительный анализ частоты выявления при эндомикардиальной биопсии фиброза миокарда трансплантата, в том числе у реципиентов, перенесших и не перенесших кризы острого отторжения трансплантированного сердца.

6. Провести сравнительный анализ концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов с наличием гистологических признаков фиброза миокарда трансплантата и без таковых; сравнить содержание галектина-3 у реципиентов сердца с диффузным, очаговым, диффузно-очаговым фиброзом.

7. Определить диагностически значимые пороговые концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации в отношении фиброза миокарда трансплантата и провести анализ диагностического значения галектина-3 при фиброзе миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения.

Научная новизна

Новыми являются данные о содержании и динамике концентрации галектина-3 у реципиентов до и в различные сроки после трансплантации сердца; о связи уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов с количеством перенесенных кризов острого отторжения трансплантата, верифицированных по данным эндомиокардиальной биопсии.

Впервые выявлена связь уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов с наличием и характером фибротических изменений миокарда трансплантата.

Впервые доказана диагностическая значимость галектина-3 при фиброзе миокарда в отдаленные сроки после трансплантации и разработан оригинальный способ неинвазивной диагностики фиброза миокарда у реципиентов, перенесших острое отторжение трансплантата.

Теоретическая и практическая значимость

Выявленная связь содержания галектина-3 в плазме крови реципиентов с наличием верифицированных гистологических признаков фиброза миокарда трансплантата может указывать на роль галектина-3 в патогенезе развития посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца.

Установленный факт влияния гуморального отторжения в большей степени, нежели острого клеточного, на развитие фиброза миокарда может иметь значение для понимания роли иммунных механизмов в развитии фибротических изменений в трансплантированном сердце.

Важной для практического использования является рассчитанная величина диагностически значимой пороговой концентрации галектина-3 в отдаленные сроки после трансплантации в отношении фиброза миокарда трансплантированного сердца.

Разработанный неинвазивный способ диагностики фиброза миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения, может иметь практическое значение при наблюдении (скрининге) реципиентов в отдаленные сроки после трансплантации.

Методология и методы исследования

В исследовании представлен анализ концентрации галектина-3 в плазме крови у пациентов с застойной сердечной недостаточностью и у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации. Охарактеризована связь уровня галектина-3 с количеством перенесенных кризов острого отторжения трансплантата; наличием и характером фибротических изменений в миокарде трансплантата, выявленных на основании гистологических и иммуногистохимических исследований образцов эндомиокардиальных биоптатов. Для определения уровней биомаркеров (галектина-3, VEGF-D, VEGF-A, PIGF, PDGF-BB, MCP-1, sCD40L) был использован иммуноферментный анализ в различных модификациях (в том числе мультиплексная технология). Для обобщения результатов настоящего исследования применялись методы параметрической и непараметрической статистики.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с терминальной сердечной недостаточностью и у реципиентов в ранние сроки после трансплантации сердца уровень галектина-3 в плазме крови выше, чем у здоровых лиц.

2. В отдаленные сроки после трансплантации уровень галектина-3 выше у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата, верифицированным по результатам ЭМБ; концентрация галектина-3 у реципиентов без признаков фиброза миокарда трансплантата не отличается от таковой у здоровых лиц.

3. Уровень галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации коррелирует с числом ранее перенесенных кризов острого отторжения трансплантированного сердца.

4. Острое отторжение трансплантированного сердца является фактором, способствующим развитию фиброза миокарда трансплантата; величина концентрации галектина-3 обладает диагностической значимостью и может служить неинвазивным биомаркером фиброза миокарда в отдаленные сроки после трансплантации.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется объемом проведенных исследований (343 образца плазмы крови, полученные от 124 пациентов, обследованных до и после трансплантации сердца; гистологический и иммуногистохимический анализ 583-х образцов биопсийного материала) с использованием современных и стандартизированных методов анализа.

Работа выполнена в рамках государственных заданий Минздрава России (2015-2017 и 2018-2020 гг.) на осуществление научных исследований и разработок по темам: «Разработка биотехнологических, биомедицинских, клинических подходов к повышению эффективности трансплантации сердца и легких» и «Разработка подходов к улучшению отдаленных результатов трансплантации сердца путем создания персонализированных методов диагностики и лечения острой и хронической дисфункции трансплантата и коморбидных состояний у реципиентов».

Апробация работы состоялась 18.07.2019 года на совместной конференции научных и клинических подразделений федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова), кафедры трансплантологии и искусственных органов лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова), кафедры кардиологии факультета дополнительного профессионального образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (РНИМУ им. Н.И. Пирогова).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016 г.), Третьем Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2017 г.), 18 Международном конгрессе Европейского общества

трансплантологов (ESOT, Барселона, Испания, 2017 г.), IX Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2018 г.), Четвертом Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019 г.).

Внедрение в практику

Результаты исследования используются в кардиологическом отделении НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова, в учебном процессе на кафедре трансплантологии и искусственных органов лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, в лечебно-диагностическом процессе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Свердловской области «Свердловская областная клиническая больница №1», г. Екатеринбург.

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в разработке концепции и постановке задач исследования; самостоятельно осуществляла сбор материала для исследования, выполнила определение концентрации биомаркеров с помощью иммуноферментного анализа. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведены статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 5 статей в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 1 публикация в зарубежном издании.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной характеристике пациентов и методам исследования, 3-х глав результатов собственных исследований, обсуждения, 7 выводов, практических рекомендаций и указателя используемой литературы, включающего 140 источников, из них 51 отечественный и 89 зарубежных. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 таблицами и 42 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включены 124 пациента с сердечной недостаточностью III – IV функционального класса по классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA) в возрасте от 16 до 71 (в среднем 48 ± 12) года, из них 106 (85%) – мужчины и 18 (15%) – женщины, которым в период с 2013 по 2016 годы в НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова была выполнена трансплантация сердца. У 67 реципиентов (51 мужчина и 16 женщин, от 16 до 71; 41 ± 12 лет) причиной развития сердечной недостаточности была дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), у 57 (55 мужчин и 2 женщины, от 37 до 70; 57 ± 8 лет) – ишемическая болезнь сердца (ИБС).

Все пациенты, имеющие показания к ТС, проходили плановое обследование согласно протоколу ведения пациентов в НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова и Национальным клиническим рекомендациям «Трансплантация сердца и механическая поддержка кровообращения». Плановое обследование после трансплантации включало клинический осмотр, термометрию, вирусологическое и бактериологическое исследования, динамику изменений общих и биохимических показателей крови с определением концентрации такролимуса, суточное мониторирование артериального давления, эхокардиографическое исследование, биопсии миокарда, ежегодное коронароангиографическое исследование.

Верификацию острого отторжения и фиброза миокарда трансплантата производили на основании исследования образцов эндомиокардиальных биоптатов. ЭМБ пациентам проводились в раннем послеоперационном и отдаленном периодах после выписки пациента из стационара, согласно протоколу ведения реципиентов сердца или по показаниям в соответствии с рекомендациями Российского трансплантологического общества.

Степень острого клеточного отторжения (ОКО) трансплантата оценивалась согласно рекомендованной классификации, принятой Международным обществом трансплантации сердца и легких (ISHLT) – ISHLT-2004 и используемой ранее ISHLT-1990. Степень гуморального отторжения (AMR) трансплантата оценивалась согласно рекомендованной классификации ISHLT-2005.

При гистологическом исследовании ЭМБ с помощью качественного метода визуализации проводилась оценка наличия, выраженности и характера фиброза: диффузный фиброз развивался в интерстициальном или периваскулярном пространстве и не сопровождался существенной потерей функционирующих клеток; при очаговом фиброзе происходило замещение погибших кардиомиоцитов с формированием соединительной ткани; диффузно-очаговый фиброз – смешанная, наиболее тяжелая форма.

Концентрацию галектина-3 измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия).

Анализ чувствительности и специфичности, подбор оптимального порога отсечения и выбор теста с наилучшей диагностической силой проводили при помощи ROC-анализа. Кроме ROC-анализа для оценки диагностической значимости галектина-3 использовали показатель относительного риска.

Анализ полученных данных производили с помощью стандартных методов статистической обработки с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и пакета прикладных программ для научно-технических расчетов IBM SPSS STATISTICS 20 (IBM SPSS Inc., США). Для проверки нормальности распределения использовался критерий Шапиро-Уилка. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение ($M \pm SD$), верхние и нижние границы 95%-ого доверительного интервала (95% ДИ) для параметрических и как медиана и интерквартильный размах для непараметрических переменных. Статистическую обработку полученных данных проводили методами непараметрической статистики: при сравнении зависимых выборок рассчитывали парный критерий Вилкоксона, для сравнения независимых переменных применяли U-критерий Манна-Уитни или Краскал-Уоллиса. Для оценки связи количественных и качественных порядковых признаков рассчитывался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всех критериев и тестов критический уровень значимости принимался равным 5%, т.е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Анализ уровня галектина-3 в плазме крови пациентов с застойной сердечной недостаточностью и реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации

Исследование уровня галектина-3 проводили в 80 образцах плазмы крови, взятой у пациентов с сердечной недостаточностью III и IV функционального класса по классификации NYHA, находящихся в листе ожидания трансплантации сердца (основная группа) и 10 образцах плазмы крови здоровых лиц (не отличающиеся по полу и возрасту от основной группы). Среди пациентов с терминальной СН было 68 (85%) мужчин (50 ± 12 лет) и 12 (25%) женщин (37 ± 9 лет). Среди обследованных пациентов причиной развития тяжелой сердечной недостаточности, послужившей показанием к трансплантации сердца, у 44-х была дилатационная кардиомиопатия, у 36 – ишемическая болезнь сердца.

Медиана уровня галектина-3 в плазме крови пациентов с терминальной стадией СН составила 15,92 [11,80; 23,65] нг/мл и была выше, чем у здоровых лиц 11,08 [7,71; 14,47] нг/мл, $p=0,00$. Распределение концентраций галектина-3 носило непараметрический характер, поэтому данные здесь и далее представлены в виде медианы концентраций [интерквартильного размаха] с указанием достоверности различий.

Уровень галектина-3 у мужчин не отличался от такового у женщин, а также не зависел от возраста пациента; не выявлено различий в концентрации галектина-3 у пациентов с ДКМП и ИБС.

Периоды наблюдения после трансплантации: от 10 до 51 (30 ± 14) суток – обозначен в тексте как ранний посттрансплантационный период или «спустя месяц»; от 127 до 398 (334 ± 69) суток – «спустя год» и от 400 до 1664 (963 ± 273) суток – «спустя 1-5 лет».

Результаты анализа концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца в различные сроки после трансплантации представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Концентрация галектина-3 в плазме крови реципиентов в ранние и отдаленные сроки после трансплантации сердца

Срок после ТС (n – число реципиентов)	Концентрация, нг/мл	
	Медиана	Интерквартильный размах
Спустя месяц (n=46)	29,21	21,97 ; 37,44
Спустя год (n=107)	18,71	13,14 ; 25,41
Спустя 1-5 лет (n=110)	19,12	14,09 ; 26,03

В первый месяц после трансплантации уровень галектина-3 в плазме крови реципиентов составил 29,21 [21,97; 37,44] нг/мл и оказался достоверно выше, чем у пациентов до трансплантации 15,92 [11,80; 23,65] нг/мл, $p=0,00$, что может быть обусловлено влиянием комплекса факторов раннего посттрансплантационного периода. Однако, в отдаленные сроки уровень галектина-3 не отличается от такового, определяемого до трансплантации ($p=0,25$).

При анализе связи величины концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца с уровнями биомаркеров, потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений, таких как факторы роста эндотелия сосудов (VEGF-D и VEGF-A), плацентарный фактор роста (PlGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF-BB), хемоаттрактантный белок макрофагов (MCP-1), растворимая форма лиганда CD40 (sCD40L) и стимулирующий фактор роста-2 (ST2), выявлена положительная корреляционная связь с PlGF ($r_s = 0,293$, $p = 0,04$) и отрицательная корреляционная связь с VEGF-D ($r_s = - 0,511$, $p = 0,00$) и MCP-1 ($r_s = - 0,285$, $p = 0,05$) спустя год после трансплантации.

Спустя год после трансплантации сердца у 75 из 107 включенных в исследование пациентов были верифицированы кризы острого отторжения трансплантата: 57 пациентов перенесли 1-2 криза (острое клеточное, $n=54$ и гуморальное, $n=3$) и 18 пациентов перенесли 3 и более криза отторжения (острое клеточное, $n=14$ и гуморальное, $n=4$).

На рисунке 1 представлен сравнительный анализ концентрации галектина-3 спустя год после трансплантации у реципиентов сердца, перенесших кризы острого отторжения трансплантата и без таковых.

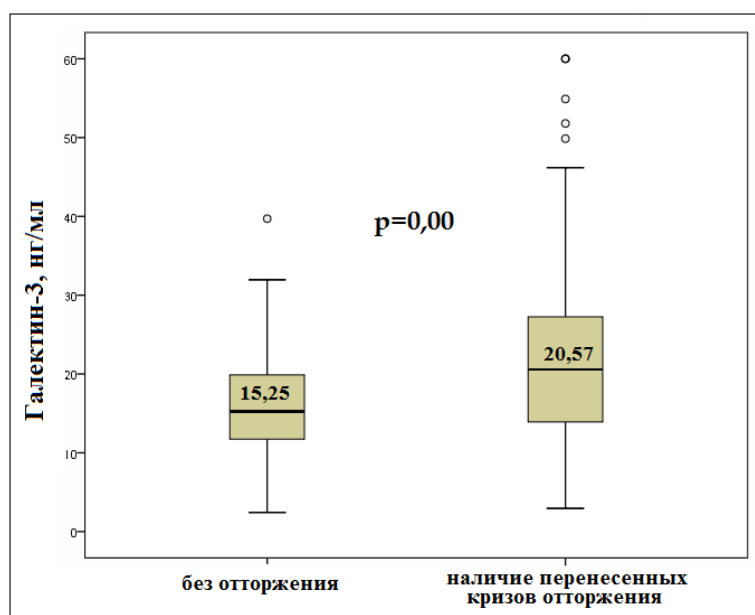


Рисунок 1 – Сравнительный анализ концентрации галектина-3 спустя год после трансплантации у реципиентов сердца, перенесших кризы острого отторжения трансплантата и без таковых

Уровень галектина-3 спустя год после трансплантации у реципиентов сердца, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, составил 20,57 [13,92; 27,24] нг/мл и был достоверно выше, чем у реципиентов без таковых 15,25 [12,06; 19,47] нг/мл, $p=0,00$.

На рисунке 2 показана корреляционная связь между концентрацией галектина-3 и количеством перенесенных кризов острого отторжения спустя год после трансплантации сердца.

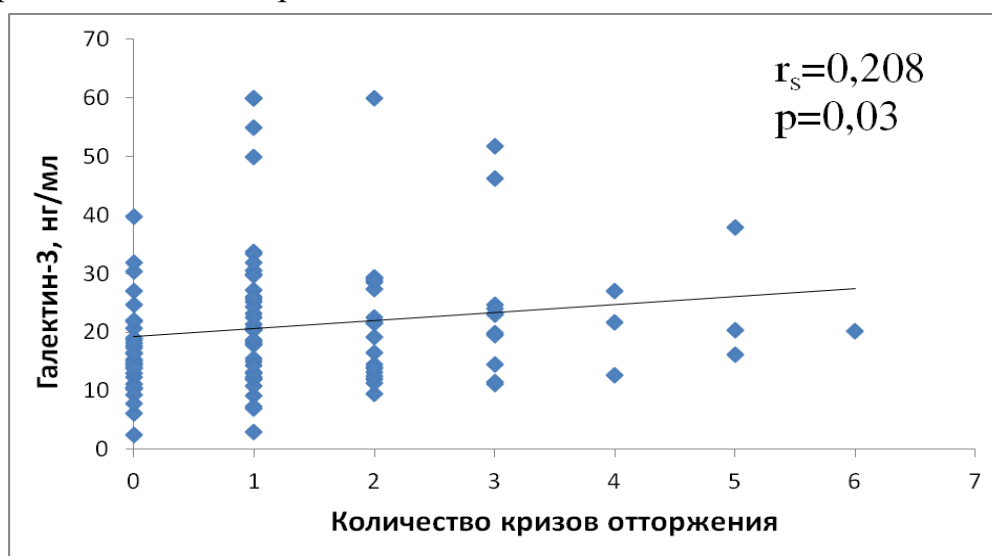


Рисунок 2 – Корреляция между концентрацией галектина-3 и количеством кризов острого отторжения спустя год после трансплантации сердца

Имеет место прямая корреляционная зависимость между числом перенесенных кризов острого отторжения трансплантированного сердца и уровнем галектина-3 ($r_s=0,208$, $p=0,03$).

Связь уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов с наличием гистологических признаков фиброза трансплантированного сердца

Исследованы 583 эндомикардиальных биоптата от 124-х пациентов (от одного пациента: от 3-х до 20-ти; в среднем 5 ± 2 ЭМБ) в различные сроки после трансплантации сердца. При гистологическом исследовании ЭМБ с помощью качественного метода визуализации проводилась оценка наличия и характера фиброза как проявления патологических изменений в миокарде трансплантата (рисунок 3).

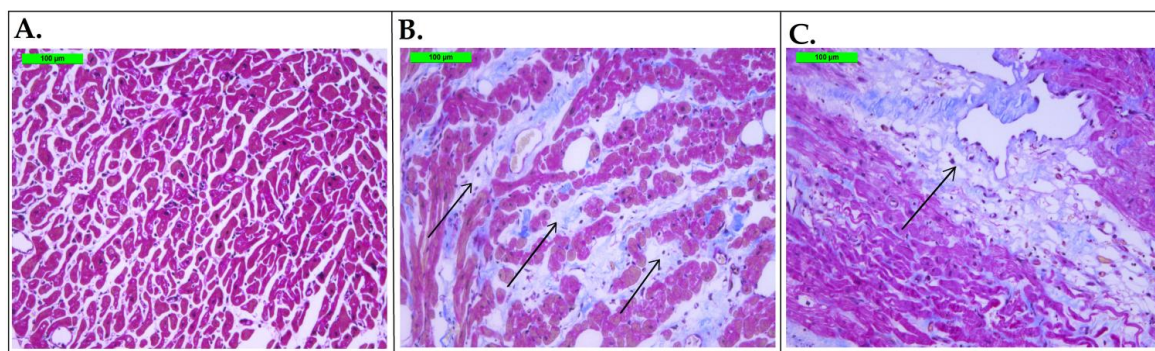


Рисунок 3 А-С – Варианты фибrotических изменений, выявленных при гистологическом исследовании эндомикардиальных биоптатов. Окраска по Массону x 200

- А. Очаговая белковая дистрофия кардиомиоцитов, очаговый умеренный отек интерстиция. Фиброз отсутствует*
В. Диффузная умеренная белковая дистрофия кардиомиоцитов. Диффузный фиброз
С. Белковая дистрофия кардиомиоцитов. Очаговый фиброз

На рисунке 3А представлен пример гистологического препарата эндомикардиальной биопсии с отсутствием фибrotических изменений в трансплантированном сердце. На рисунке 3В представлен пример эндомикардиального биоптата с диффузным фиброзом, который развивается в интерстициальном или периваскулярном пространстве и не сопровождается существенной потерей функционирующих клеток. На рисунке 3С представлен пример эндомикардиального биоптата с очаговым фиброзом, при котором происходит замещение погибших кардиомиоцитов с формированием соединительной ткани. В ходе нашего исследования в эндомикардиальных биоптатах встречались признаки сочетанной формы – диффузно-очаговой, которая является наиболее тяжелой формой фиброза.

На рисунке 4 представлена доля реципиентов, в биоптатах которых в ранние и отдаленные сроки после трансплантации выявлены гистологические признаки фиброза миокарда трансплантата.

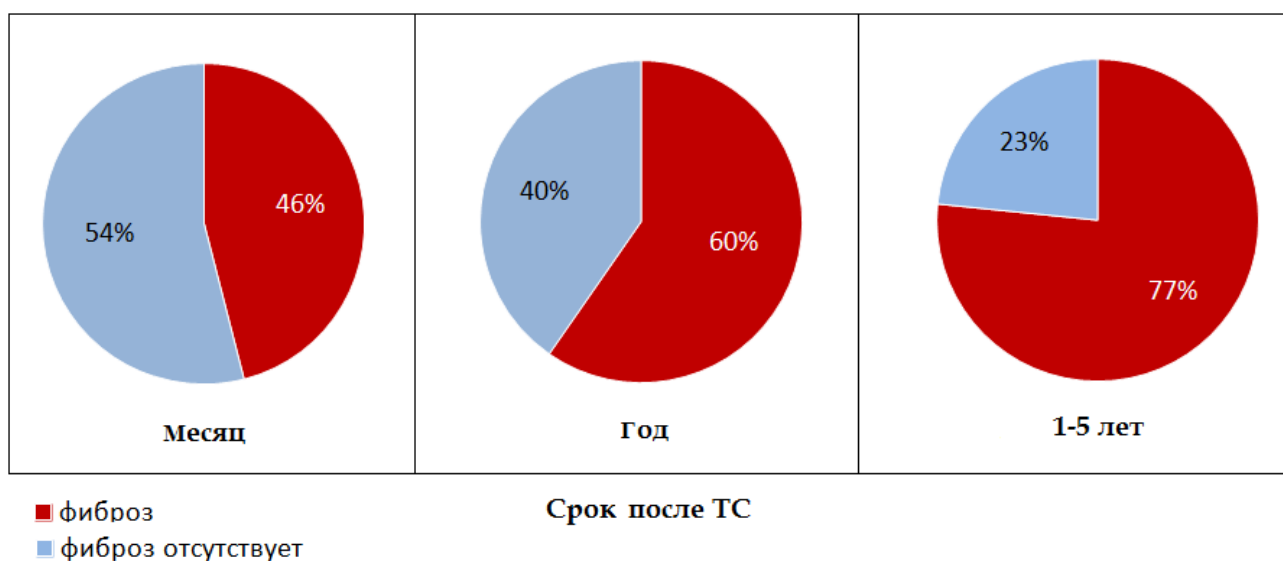


Рисунок 4 – Доля реципиентов (%), в биоптатах которых в ранние и отдаленные сроки после трансплантации выявлены гистологические признаки фиброза миокарда трансплантата

К концу первого месяца после трансплантации у 58 (46%) из 124-х включенных в исследование реципиентов сердца были выявлены патологические изменения в миокарде – фиброз трансплантата. Спустя год после ТС по результатам ЭМБ у 74-х (60%) верифицирован фиброз миокарда. Спустя 1-5 лет после ТС уже у 95 (77%) реципиентов верифицирован фиброз миокарда трансплантата. Анализ показал увеличение доли реципиентов, в биоптатах которых выявлены гистологические признаки фиброза миокарда трансплантата с течением времени после трансплантации сердца.

На рисунке 5 представлена встречаемость фиброза миокарда по виду у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после ТС.

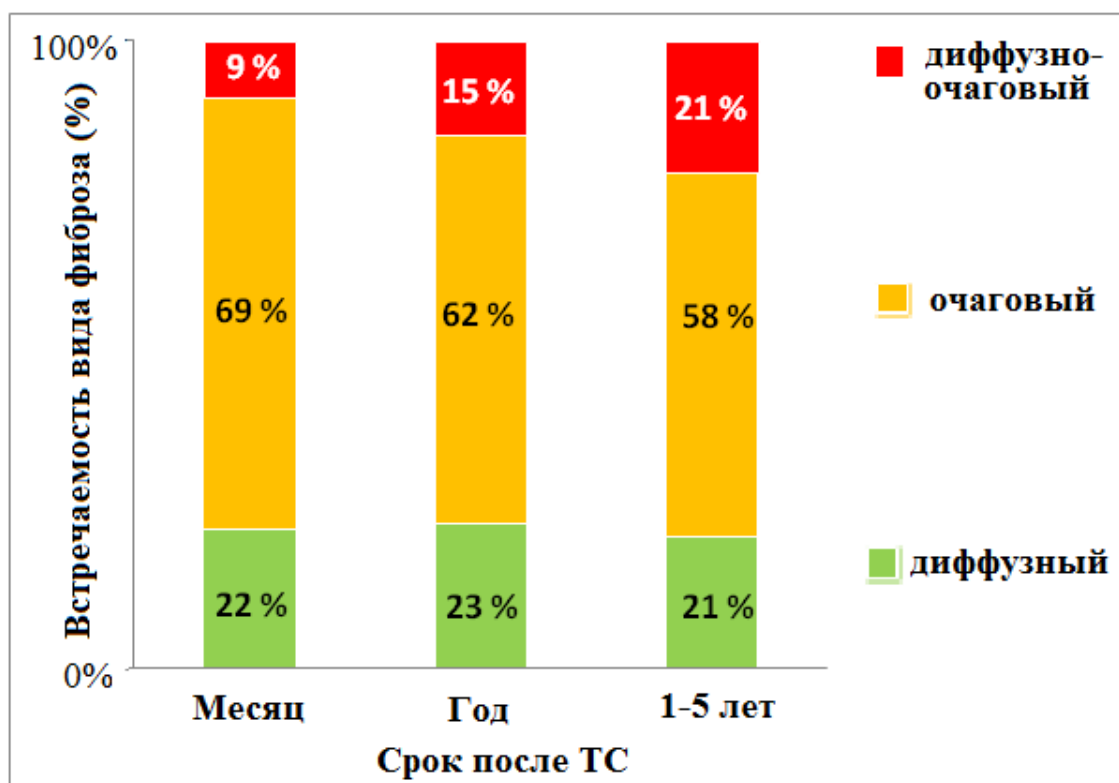


Рисунок 5 – Встречаемость фиброза по виду у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации

К концу первого месяца после трансплантации из 58 реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата у 13 (22%) верифицирован диффузный фиброз, у 40 (69%) – очаговый и у 5 (9%) – диффузно-очаговый фиброз. Спустя год после трансплантации из 74-х реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата у 17 (23%) верифицирован диффузный фиброз, у 46 (62%) – очаговый и у 11 (15%) – диффузно-очаговый фиброз. Спустя 1-5 лет после ТС из 95 реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата у 20 (21%) верифицирован диффузный фиброз, у 55 (58%) – очаговый и у 20 (21%) – диффузно-очаговый фиброз. Анализ показал увеличение доли реципиентов сердца с наиболее тяжелой, диффузно-очаговой, формой фиброза с течением времени после трансплантации.

В ранние сроки после трансплантации фиброз миокарда трансплантата среди пациентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, обнаружен у 31 (41%) из 75 реципиентов. Спустя год после трансплантации фиброз миокарда трансплантата среди реципиентов, перенесших кризы острого отторжения, верифицирован у 51 (57%) из 89 реципиентов: таким образом, доля реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата возросла на 39% в сравнении с ранним посттрансплантационным периодом (месяц). Спустя 1-5 лет после трансплантации фиброз миокарда трансплантата среди реципиентов, перенесших

кризы острого отторжения, верифицирован у 71 (77%) из 92-х реципиентов – доля реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата возросла еще на 35% в сравнении с первым годом после ТС.

В ранние сроки после трансплантации у пациентов, не перенесших кризы острого отторжения, фиброз миокарда трансплантата был выявлен у 27 (55%) из 49 реципиентов. Спустя год после трансплантации фиброз миокарда трансплантата среди реципиентов, не перенесших кризы острого отторжения, верифицирован у 23 (65%) из 35 реципиентов; т.е. доля реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата возросла на 18% в сравнении с ранним посттрансплантационным периодом. Спустя 1-5 лет после трансплантации фиброз миокарда трансплантата верифицирован у 24 (75%) из 32-х реципиентов – доля реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата возросла еще на 15% в сравнении с первым годом после ТС.

Сравнительный анализ частоты выявления и характера гистологических признаков фиброза миокарда у реципиентов, перенесших и не перенесших кризы острого отторжения трансплантата, показал увеличение доли реципиентов с гистологическими признаками фиброза в обеих группах с течением времени после трансплантации. Однако, в отдаленные сроки после трансплантации в разной степени возрастает число реципиентов сердца с верифицированным при ЭМБ фиброзом миокарда трансплантата: у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения – на 88%, у реципиентов без кризов отторжения – на 37%, в сравнении с ранним посттрансплантационным периодом.

Также замечено, что спустя 1-5 лет после трансплантации у реципиентов, перенесших кризы гуморального отторжения, фиброз миокарда трансплантата выявляется чаще (в 92% случаев), чем у реципиентов, перенесших кризы острого клеточного отторжения (в 75% случаев).

Однако, сами по себе данные о числе перенесенных кризов острого клеточного и/или гуморального отторжения не имеют диагностической значимости для выявления риска фиброза миокарда в силу их низкой чувствительности.

В связи с этим, нами был проведен анализ галектина-3 у реципиентов с фибротическими изменениями миокарда трансплантата, в том числе у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения.

При исследовании концентрации галектина-3, выявлено, что повышенное содержание биомаркера в плазме крови в отдаленные сроки после трансплантации имеет место у реципиентов с наличием фибротических изменений

трансплантированного сердца, выявленных на основании ЭМБ. Сравнительный анализ уровней галектина-3 в ранние и отдаленные сроки после трансплантации сердца у реципиентов с наличием фиброза миокарда трансплантата и без такового представлен на рисунке 6.

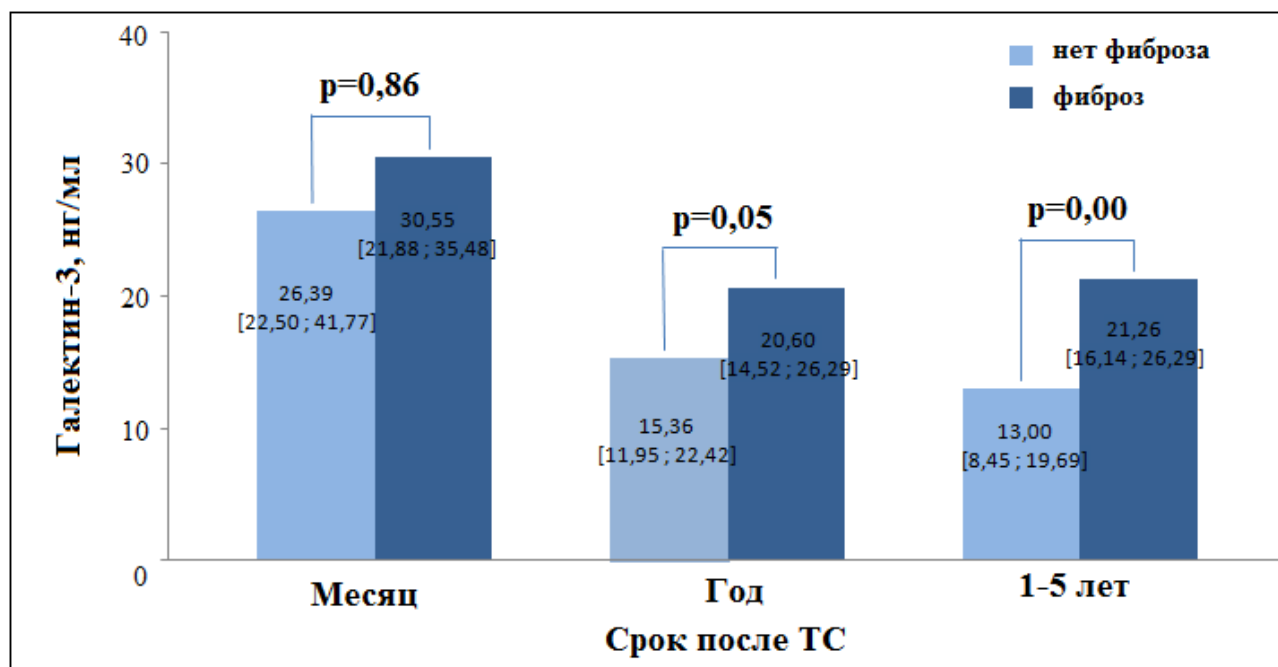
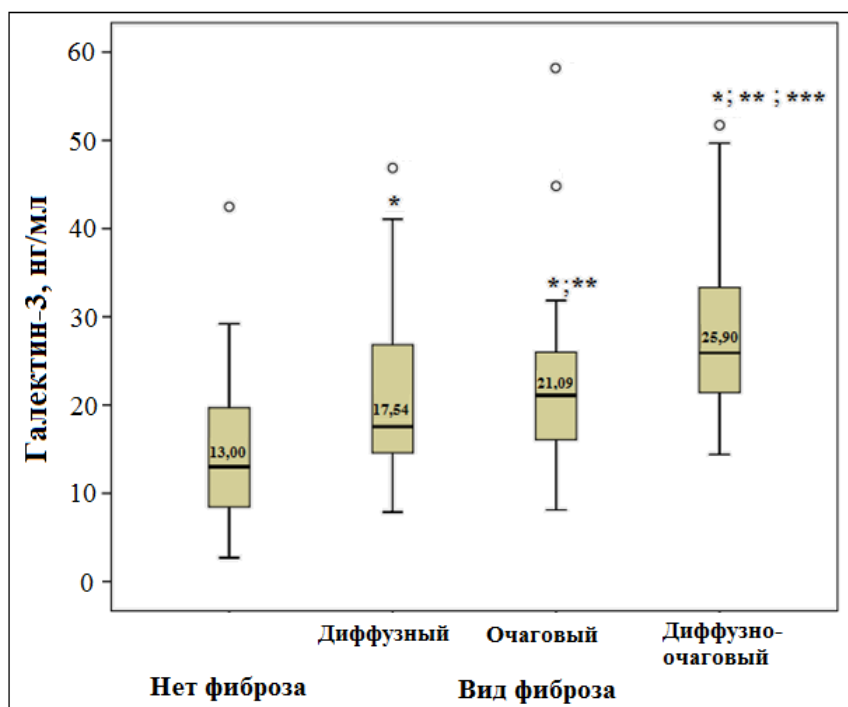


Рисунок 6 – Сравнительный анализ медианы концентраций галектина-3 в ранние и отдаленные сроки после трансплантации сердца у реципиентов с наличием фиброза миокарда и без такового

При исследовании медианы концентраций галектина-3 в отдаленные сроки после трансплантации сердца были выявлены достоверные различия у пациентов с наличием фиброза в миокарде трансплантата и без такового. Повышенное содержание галектина-3 свидетельствует о наличии фибротических изменений, верифицированных по результатам ЭМБ. У реципиентов сердца при отсутствии фиброза миокарда трансплантата прослеживается тенденция к снижению концентрации галектина-3 в плазме крови с течением времени после трансплантации до уровня, характерного для здоровых лиц. Медианы концентраций галектина-3 у здоровых лиц 11,08 [7,71; 14,47] нг/мл и у реципиентов спустя 1-5 лет после ТС при отсутствии фиброза миокарда трансплантата 13,00 [8,45 ; 19,69] нг/мл не различались ($p=0,29$).

Сравнительный анализ медианы концентраций галектина-3 спустя 1-5 лет после ТС у реципиентов с разными видами фиброза миокарда и без такового представлен на рисунке 7.



- * $p < 0,05$, в сравнении с отсутствием фиброза
- ** $p < 0,05$, в сравнении с диффузным фиброзом
- *** $p < 0,05$, в сравнении с очаговым фиброзом

Рисунок 7 – Сравнительный анализ медианы концентраций галектина-3 спустя 1-5 лет после трансплантации сердца у реципиентов с разными видами фиброза миокарда и без такового

Спустя 1-5 лет после ТС высокие концентрации галектина-3 связаны с видом фиброза миокарда: более высокие значения у реципиентов сердца с диффузно-очаговым фиброзом ($n=15$; 25,90 [21,43; 33,30] нг/мл). У реципиентов с диффузным фиброзом ($n=18$; 17,54 [14,85 ; 26,81] нг/мл), как и у реципиентов с очаговым фиброзом ($n=50$; 21,09 [16,29 ; 25,97] нг/мл) уровень галектина-3 был достоверно выше в сравнении с пациентами без фиброза миокарда (13,00 [8,45 ; 19,69] нг/мл), $p=0,01$ и $p=0,00$, соответственно.

Анализ диагностической значимости галектина-3 у реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации

Обнаруженные в ходе настоящего исследования различия концентрации галектина-3 у пациентов с наличием или отсутствием фибротических изменений в миокарде трансплантата по результатам ЭМБ имели место в отдаленном периоде после трансплантации сердца, но не в раннем. В связи с этим, проведена оценка диагностической значимости галектина-3 в отношении фиброза миокарда в отдаленные сроки после трансплантации.

Пороговое значение галектина-3, значимое для диагностики фиброза миокарда трансплантата, спустя год после трансплантации составило 18,2 нг/мл, спустя 1-5 лет – 16,9 нг/мл (рисунок 8).

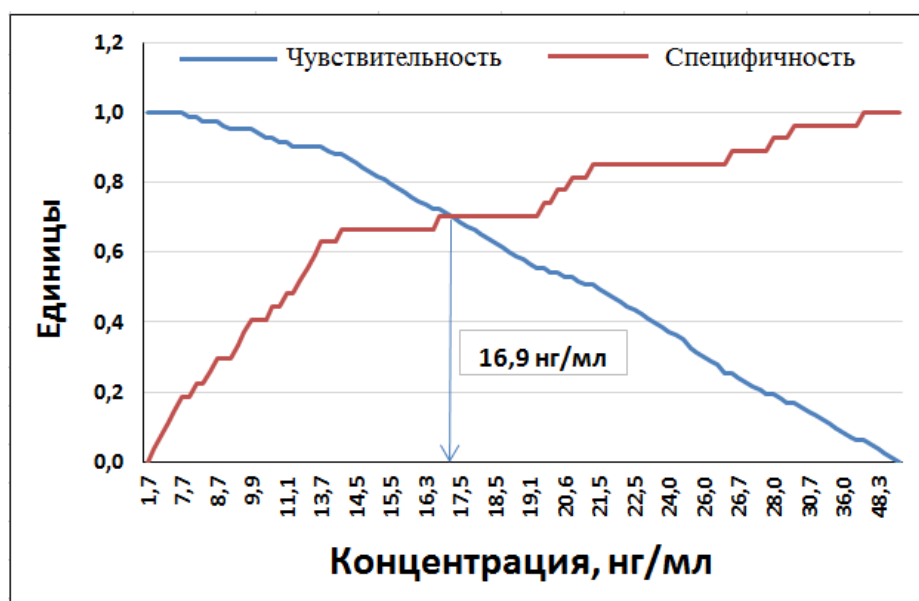


Рисунок 8 – Определение диагностически значимого порогового значения уровня галектина-3 спустя 1-5 лет после трансплантации в отношении фиброза миокарда трансплантата

Данные расчета относительного риска фиброза миокарда у реципиентов в отдаленные сроки после трансплантации при концентрации галектина-3, превышающей рассчитанное пороговое значение; 95%-ного доверительного интервала, а также значений чувствительности и специфичности теста на галектин-3, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Относительный риск выявления фиброза миокарда в отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов при концентрации галектина-3 выше рассчитанного порогового значения

Срок после ТС	Относительный риск	Нижняя граница 95% ДИ	Верхняя граница 95% ДИ	Чувствительность %	Специфичность %
Год	1,3±0,1	0,9	1,8	59	58
1-5 лет	1,6±0,1	1,2	2,0	71	70

Границы доверительного интервала включали единицу, следовательно, влияние концентрации галектина-3 на риск развития фиброза миокарда трансплантата у реципиентов спустя год после трансплантации не было статистически значимым.

При уровне галектина-3, превышающем найденное пороговое значение, вероятность риска развития фиброза миокарда трансплантата у реципиентов

сердца спустя 1-5 лет после трансплантации выше в 1,6 раза ($RR=1,6\pm 0,1$ [95% ДИ 1,2–2,0]), чувствительность – 71%, специфичность – 70%), чем у реципиентов с уровнем галектина-3 ниже этого порогового значения.

Диагностическая значимость теста в формате настоящего исследования имела место при фиброзе миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантата. Данные расчета относительного риска фиброза миокарда в отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, при концентрации галектина-3, превышающей рассчитанное пороговое значение, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Относительный риск выявления фиброза миокарда в отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, при концентрации галектина-3, превышающей рассчитанное пороговое значение

Срок после ТС	Относительный риск	Нижняя граница 95% ДИ	Верхняя граница 95% ДИ	Чувствительность %	Специфичность %
Год	1,36±0,2	0,9	2,0	66	54
1-5 лет	1,64±0,1	1,1	2,2	71	75

Факт наличия перенесенных кризов острого отторжения трансплантата является значимым в отношении развития фиброза миокарда трансплантата спустя 1-5 лет после трансплантации: при уровне галектина-3, превышающем рассчитанное пороговое значение ($\geq 16,9$ нг/мл), вероятность наличия признаков фиброза миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, выше в 1,64 раза ($RR=1,64\pm 0,1$ [95% ДИ 1,1–2,2]), чувствительность – 71%, специфичность – 75%), чем у реципиентов с уровнем галектина-3 ниже этого порогового значения ($\leq 16,9$ нг/мл). Уровень галектина-3 имеет диагностическое значение при фиброзе миокарда трансплантата как у реципиентов, перенесших 1-2 криза, так и у реципиентов, перенесших 3 и более криза острого отторжения трансплантата.

Результаты настоящей работы показали, что измерение концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов в различные сроки после трансплантации позволяет с одной стороны, оценивать процесс развития посттрансплантационных осложнений, с другой стороны – являться клинически значимым с точки зрения диагностики фиброза миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантационного сердца.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с застойной сердечной недостаточностью, ожидающих трансплантацию сердца, медиана концентрации галектина-3 в плазме крови превышает таковую у здоровых лиц ($p = 0,00$) и не зависит от возраста, гендерных различий и этиологии сердечной недостаточности.

2. В раннем посттрансплантационном периоде уровень галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца достоверно выше, но в отдаленные сроки не отличается от такового, определяемого до трансплантации ($p = 0,00$ и $p = 0,25$, соответственно).

3. Концентрация галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца спустя год после трансплантации коррелирует с уровнем биомаркеров, потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений: плацентарного фактора роста (PlGF, $r_s = 0,293$, $p = 0,04$), фактора роста эндотелия сосудов-D (VEGF-D, $r_s = - 0,511$, $p = 0,00$) и хемоаттрактантного белка макрофагов (MCP-1, $r_s = - 0,285$, $p = 0,05$).

4. Уровень галектина-3 в плазме крови в отдаленные сроки после трансплантации сердца достоверно выше у реципиентов, перенесших острое отторжение трансплантата; имеет место прямая зависимость между числом перенесенных кризов отторжения и уровнем галектина-3 ($r_s=0,208$; $p = 0,03$ спустя год после трансплантации).

5. В отдаленные сроки после трансплантации возрастает число реципиентов сердца с верифицированным при эндомиокардиальной биопсии фиброзом миокарда: у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения – на 88%, у реципиентов без кризов отторжения – на 37%, в сравнении с ранним посттрансплантационным периодом. У реципиентов, перенесших острое гуморальное отторжение, фиброз миокарда трансплантата выявляется чаще (92% случаев), чем у реципиентов, перенесших острое клеточное отторжение (75%).

6. В отдаленные сроки уровень галектина-3 в плазме крови выше у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата ($p = 0,05$ спустя год и $p = 0,01$ спустя 1-5 лет после трансплантации). Спустя год после трансплантации содержание галектина-3 достоверно выше у реципиентов с диффузно-очаговым фиброзом ($p = 0,01$), чем у реципиентов без такового; спустя 1-5 лет – у реципиентов с диффузно-очаговым ($p = 0,00$), очаговым ($p = 0,00$) и диффузным ($p = 0,01$) фиброзом.

7. Диагностически значимая пороговая концентрация галектина-3 в отношении фиброза миокарда трансплантированного сердца спустя 1-5 лет после трансплантации составляет 16,9 нг/мл. У реципиентов, перенесших кризы острого отторжения, при уровне, превышающем рассчитанное пороговое значение, риск развития фиброза миокарда трансплантата выше (RR=1,64±0,1 [95% ДИ 1,1–2,2], чувствительность 71%, специфичность 75%), чем у реципиентов с уровнем галектина-3 ниже порогового значения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Контроль уровня галектина-3 может быть использован для выявления пациентов с наличием фибротических изменений миокарда трансплантированного сердца.

Измерение в плазме венозной крови уровня галектина-3 в отдаленные сроки после трансплантации сердца у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, позволяет выявить пациентов с повышенной вероятностью наличия признаков фиброза в миокарде трансплантата.

**СПИСОК РАБОТ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **ST2 при отторжении трансплантированного сердца / О.П. Шевченко, А.А. Улыбышева, Д.А. Великий, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. XVII. – №4. – С.96-100.**

2. Является ли дотрансплантационный уровень PDGF-BB предиктором острого клеточного отторжения трансплантированного сердца? / Е.А. Стаханова, А.О. Шевченко, Н.П. Можейко, О.Е. Гичкун, **А.А. Улыбышева**, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. XVIII. – С.50.

3. ST2 у пациентов с сердечной недостаточностью и реципиентов сердца / А.О. Шевченко, **А.А. Улыбышева**, Д.А. Великий, А.В. Ефимова, Е.А. Зубкова, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. XVIII. – С.56.

4. **Диагностическое значение тромбоцитарного фактора роста PDGF-BB и ST2 при отторжении трансплантированного сердца / О.П. Шевченко, А.А. Улыбышева, А.В. Аксенова, Н.П. Можейко, Е.А. Стаханова, В.В. Донцов, Е.А. Никитина, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. XVIII. – №4. – С.71-76.**

5. Величина концентрации ST2 в плазме крови связана с выраженностью морфологических признаков острого отторжения трансплантированного сердца / О.Е. Гичкун, **А.А. Улыбышева**, А.В. Аксенова, Н.П. Можейко, А.О. Шевченко, Д.А. Великий, Л.В. Макарова, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. XIX. – С.78-79.

6. Пороговые концентрации PDGF-BB и ST2, диагностически значимые при остром отторжении трансплантированного сердца / А.В. Аксенова, **А.А. Улыбышева**, О.Е. Гичкун, Е.А. Стаханова, Г.А. Олефиренко, А.О. Шевченко, Н.П. Можейко, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. XIX. – С.80-81.

7. **Сравнительный анализ диагностической значимости панелей биомаркеров у реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации / О.П. Шевченко, А.В. Аксенова, А.А. Улыбышева, Н.П. Можейко, Е.А. Никитина, В.И. Орлов, Е.А. Стаханова, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. XIX. – №2. – С.27-33.**

8. Plasma ST2 before and after heart transplantation / S. Gautier, A. Shevchenko, N. Mozheiko, O. Gichkun, A. Aksenova, **A. Ulybysheva**, V. Orlov, G. Salikhova, O. Shevchenko // *Transplant International*. – 2017. – Vol. 30. – p.224.

9. Уровень галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца в отличие от уровня ST2 не коррелирует с результатами исследования эндомиокардиального биоптата / **А.А. Улыбышева**, О.Е. Гичкун, А.В. Аксенова, А.О. Шевченко, Н.П. Можейко, О.П. Шевченко // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2018. – Т. XX. – С.51-52.

10. Галектин-3 у реципиентов сердца / А.А. Улыбышева, О.П. Шевченко, О.Е. Гичкун, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. XXI. – №2. – С.145-150.

11. Галектин-3 при отторжении и фиброзе трансплантированного сердца / О.П. Шевченко, А.А. Улыбышева, О.Е. Гичкун, Н.П. Можейко, Е.А. Стаханова, В.С. Кван, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. XXI. – №3. – С.62-68.

12. Связь уровня галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца с наличием гистологических признаков фиброза миокарда трансплантата / О.П. Шевченко, **А.А. Улыбышева**, Н.П. Можейко, О.Е. Гичкун, Е.А. Стаханова, В.С. Кван, А.О. Шевченко // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2019. – Т. XXI. – С.51.

13. Уровень галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца коррелирует с количеством перенесенных кризов острого отторжения трансплантата / **А.А. Улыбышева**, Н.П. Можейко, О.Е. Гичкун, Е.А. Стаханова, А.О. Шевченко, О.П. Шевченко // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2019. – Т. XXI. – С.53.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДКМП	Дилатационная кардиомиопатия
ИБС	Ишемическая болезнь сердца
СН	Сердечная недостаточность
ОКО	Острое клеточное отторжение
ТС	Трансплантация сердца
ЭМБ	Эндомиокардиальная биопсия
AMR	Гуморальное (антителоопосредованное) отторжение
ISHLT	(англ., International society for heart and lung transplantation) Международное общество трансплантации сердца и легких
MCP-1	Моноцитарный хемоаттрактантный белок-1
NT-proBNP	N-терминальный участок мозгового натрийуретического пептида
NYHA	(англ., New York Heart Association) Нью-Йоркская ассоциации кардиологов
PDGF-BB	Фактор роста тромбоцитов
PlGF	Плацентарный фактор роста
RR	Относительный риск
sCD40L	Растворимая форма лиганда CD40
ST2	Стимулирующий фактор роста-2
TGF- β 1	Трансформирующий фактор роста β 1
VEGF-A	Факторы роста эндотелия сосудов - A
VEGF-D	Факторы роста эндотелия сосудов - D