

ВЕЛИКИЙ ДМИТРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**МИКРОРНК И ПРОТЕОМНЫЕ БИОМАРКЕРЫ
У РЕЦИПИЕНТОВ СЕРДЦА: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2021

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 консультант:

член-корреспондент РАН

доктор медицинских наук, профессор

Шевченко Алексей Олегович

Официальные оппоненты:

Космачева Елена Дмитриевна – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой терапии №1 факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель главного врача по медицинской части Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 им. профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края.

Долгов Владимир Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

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

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «15» марта 2022 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного Совета ДСТИО 001.21 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 «___»

2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета ДСТИО 001.21

кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время единственным радикальным методом лечения пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности является трансплантация сердца. Значительные достижения в области хирургической техники и совершенствование иммуносупрессивной терапии позволили увеличить выживаемость и улучшить качество жизни реципиентов сердца. Основной целью ведения пациентов после трансплантации сердца является предотвращение развития посттрансплантационных осложнений наряду с минимизацией дозы иммуносупрессивных препаратов [Готье С.В. и соавт., 2014].

В раннем послеоперационном периоде и в течение первого года жизни после трансплантации основным патологическим фактором, ограничивающим выживаемость реципиентов сердца, является острое клеточное и острое антителоопосредованное (гуморальное) отторжение трансплантата. Одним из основных факторов, негативно влияющих на отдаленный прогноз у реципиентов сердца, является васкулопатия трансплантата, которая по своей природе является проявлением хронического отторжения и характеризуется диффузным протяженным концентрическим стенозом стенок коронарных артерий трансплантированного сердца [Шумаков В.И., 2008]. Формированию фиброза миокарда и развитию субклинической хронической сердечной недостаточности у реципиентов сердца способствуют острое и хроническое отторжение трансплантата, а также ряд сопутствующих заболеваний, среди которых артериальная гипертензия, сахарный диабет, метаболический синдром и другие [Шевченко А.О. и соавт., 2018].

Для обеспечения длительного функционирования трансплантированного органа необходимы ранняя диагностика осложнений и назначение своевременного лечения [Crespo-Leiro MG et al., 2017]. Стандартом для верификации и определения характера патологии трансплантированного сердца (острое отторжение, фиброз) является эндомиокардиальная биопсия (ЭМБ), которая выполняется после трансплантации в сроки, предусмотренные протоколом, а также при проявлении признаков нарушения функции трансплантата [Готье С.В. и соавт., 2014]; патология коронарных артерий верифицируется при коронароангиографическом исследовании [Миронков Б.Л. и соавт., 2014]. Ограничения и риски, связанные с применением инвазивных методов, особенно при их многократном применении, послужили стимулом к поиску и разработке неинвазивных и/или малоинвазивных методов скрининга

и диагностики посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца [Oh KT et al., 2021].

В последние два десятилетия было доказано участие ряда протеомных биомаркеров в развитии сердечно-сосудистых осложнений у больных сердечной недостаточностью и у пациентов с трансплантированным сердцем, а также возможность их использования для прогнозирования, диагностики и оценки риска острого отторжения (ST2, sCD30, sCD40L и др.), болезни коронарных артерий (гомоцистеин, PlGF, PAPP-A и др.), фиброза сердечного трансплантата (галектин-3, NT-proBNP) [Шевченко О.П. и соавт., 2015, Kransdorf EP, Kobashigawa JA, 2017, van Gelder T, 2017, Starling RC et al., 2017, Savic-Radojevic A et al., 2017]. Результаты анализа биомаркеров посттрансплантационных осложнений могут быть полезны для снижения числа инвазивных вмешательств у реципиентов сердца, в то же время ограничение их эффективности определяется многофакторностью поражения трансплантата и неспецифичностью каждого биомаркера, в связи с чем более эффективными представляются мультимаркерные тесты.

Качественно новым шагом в ранней диагностике осложнений после трансплантации явилось исследование потенциальных биомаркеров на дотрансляционном уровне. Отдельную группу сигнальных молекул, рассматриваемых в качестве перспективных кандидатов на роль биомаркеров посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца, составляют микроРНК – малые некодирующие РНК, регулирующие экспрессию генов и играющие важную роль в регуляции функций как здоровых, так и поврежденных клеток. Результаты недавних исследований показывают значение микроРНК при сердечно-сосудистых заболеваниях [Galluzzo A et al., 2021, Ali Sheikh MS et al., 2021] и остром отторжении трансплантированных органов [Novák J et al., 2021, Di Francesco A et al., 2018]. Однако исследований, посвященных изучению роли и диагностической значимости микроРНК при развитии посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца, как и других солидных органов, в настоящее время опубликовано крайне мало.

Цель исследования

Определить клиническое значение экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов сердца и диагностическую эффективность сочетания до- и посттранскрипционных биомаркеров при патологии сердечного трансплантата.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать уровень экспрессии микроРНК – miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424, в плазме крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью и определить связь величины экспрессии микроРНК с клиническими и лабораторными данными
2. У пациентов с хронической сердечной недостаточностью – потенциальных реципиентов сердца, определить связь величины экспрессии микроРНК в плазме крови с концентрацией протеомных биомаркеров, значимых при развитии посттрансплантационных осложнений у реципиентов солидных органов
3. Охарактеризовать уровень экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации и определить связь величины экспрессии микроРНК с клиническими и лабораторными данными, а также с концентрацией протеомных биомаркеров, значимых при развитии посттрансплантационных осложнений
4. Провести сравнительный анализ величины экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у реципиентов с наличием морфологических признаков острого отторжения трансплантата и без таковых и выявить показатели, уровень экспрессии которых связан с острым отторжением трансплантата.
5. Оценить диагностическую эффективность miR-101 и miR-27, а также их сочетаний, с оценкой концентрации протеомного биомаркера отторжения ST2, – при остром отторжении трансплантированного сердца
6. Охарактеризовать связь уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов сердца с наличием ангиографических признаков поражения коронарных артерий пересаженного сердца и оценить диагностическую эффективность miR-339 в отношении стенотических повреждений коронарных артерий пересаженного сердца
7. Охарактеризовать связь уровня экспрессии микроРНК – miR-27, miR-101, miR-142, miR-339, miR-424, и концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца с наличием морфологических признаков фиброза миокарда трансплантата
8. Оценить диагностическую эффективность miR-27 и miR-339 у реципиентов сердца в отношении фиброза миокарда трансплантата и комплексных тестов на основе сочетания микроРНК и галектина-3

Научная новизна

Впервые выявлены и охарактеризованы изменения профиля экспрессии микроРНК (miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424) у больных хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации.

Новыми являются данные о корреляции уровня циркулирующих микроРНК в плазме крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца с концентрацией протеомных биомаркеров посттрансплантационных осложнений: галектина-3 (miR-339), MCP-1 (miR-27), PlGF (miR-101, miR-27), ST2 (miR-27) и PAPP-A (miR-101).

Разработаны и валидированы ряд неинвазивных тестов для диагностики патологии сердечного трансплантата, основанных на сочетании молекулярно-генетических (miR-101, miR-27, miR-339) и протеомных (ST2, галектин-3) биомаркеров.

Установлена связь между изменением уровня экспрессии miR-101, miR-27 и верифицированным острым отторжением трансплантированного сердца. Впервые рассчитана диагностическая эффективность miR-101 и miR-27, а также комплексных тестов, основанных на сочетании микроРНК и протеомного биомаркера ST2 при остром отторжении, остром клеточном отторжении трансплантата.

Новыми являются данные о связи между уровнем экспрессии miR-339 и наличием стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца. Доказана диагностическая эффективность miR-339 при хроническом отторжении сердечного трансплантата.

Впервые установлена связь между уровнем циркулирующих miR-27, miR-339 и верифицированным фиброзом миокарда у реципиентов сердца; определена диагностическая эффективность микроРНК, а также комплексных тестов на основе miR-27, miR-339 и галектина-3 в отношении фиброза миокарда трансплантата.

Теоретическая и практическая значимость

Данные о профиле экспрессии микроРНК и изменении уровня циркулирующих miR-101, miR-27 и miR-339 у реципиентов сердца, а так же связи этих показателей с клиническими, лабораторными параметрами и концентрацией протеомных биомаркеров посттрансплантационных осложнений, указывают на возможное участие этих микроРНК в регуляции гомеостаза у реципиентов сердца и служат основой концепции для разработки новых подходов к диагностике и лечению патологии сердечного трансплантата.

Контроль уровня циркулирующих микроРНК может быть полезным для оценки состояния пациентов после трансплантации сердца.

Разработанный неинвазивный способ диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца, основанный на совместном определении величины экспрессии miR-101 и концентрации ST2, может иметь практическое значение при наблюдении реципиентов после трансплантации.

Измерение уровня экспрессии miR-339 может быть использовано в качестве скринингового лабораторного индикатора для выявления реципиентов сердца с риском развития стенотического поражения коронарных артерий трансплантата.

Перспективы практического использования имеют выявленная диагностическая эффективность miR-27 при развитии фиброза миокарда трансплантированного сердца, а также повышение диагностических характеристик miR-27 в комбинации с измерением концентрации галектина-3.

Применение диагностических тестов на основе микроРНК и протеомных биомаркеров у реципиентов сердца может потенциально сократить частоту инвазивных диагностических вмешательств или частично заменить их, что расширит возможности персонафицированного подхода к ранней диагностике посттрансплантационных осложнений и тактике послеоперационного ведения пациентов.

Методология и методы исследования

В исследовании представлены результаты анализа уровня экспрессии пяти микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) в плазме крови у пациентов с хронической сердечной и дыхательной недостаточностью в терминальной стадии и у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации. Охарактеризована связь уровня экспрессии микроРНК с клиническими и лабораторными показателями, а также с концентрацией протеомных биомаркеров до и после трансплантации; исследована зависимость

величины экспрессии микроРНК и протеомных биомаркеров от наличия посттрансплантационных осложнений, выявленных на основании гистологических и иммуногистохимических исследований образцов эндомикардиальных биоптатов и результатов коронароангиографии. Для определения уровней экспрессии микроРНК был применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для определения уровней протеомных биомаркеров использован иммуноферментный анализ в различных модификациях. Для анализа и обобщения результатов настоящего исследования применялись методы параметрической и непараметрической статистики, что обусловлено особенностями распределения значений исследуемых величин.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Величина экспрессии miR-27, miR-339 и miR-424 в плазме крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью выше, чем у здоровых лиц. Изменения профиля экспрессии микроРНК не специфичны для сердечно-сосудистых заболеваний: у пациентов с хронической дыхательной недостаточностью уровень циркулирующих miR-27, miR-339 и miR-424 также выше, чем у здоровых и не отличается от такового у потенциальных реципиентов сердца.

2. У реципиентов сердца изменение экспрессии отдельных микроРНК в плазме крови коррелирует с патологией сердечного трансплантата, верифицированной по данным эндомикардиальной биопсии (острое отторжение, фиброз миокарда) и коронароангиографического исследования (стенотическое поражение коронарных артерий трансплантата) и может служить основой малоинвазивных тестов для скрининга посттрансплантационных осложнений и персонализированной коррекции протокола инвазивных вмешательств.

3. Комплексный анализ молекулярно-генетических (микроРНК) и протеомных биомаркеров, с учетом рассчитанных диагностически значимых пороговых значений всех показателей, повышает диагностическую эффективность микроРНК при патологии сердечного трансплантата.

4. Для острого отторжения трансплантированного сердца характерно снижение экспрессии miR-101 и miR-27 при повышении уровня ST2 в плазме крови. Сочетание этих параметров диагностически эффективно при остром отторжении трансплантата: дуплексный тест на miR-101 и ST2 позволяет

выявить пациентов с риском острого клеточного отторжения, в 4 раза превышающим таковой у остальных реципиентов.

5. У реципиентов с величиной экспрессии miR-339 ниже -7,9 отн. ед. в 6 раз увеличен риск выявления при ангиографическом исследовании стенотического поражения коронарных артерий пересаженного сердца.

6. Диагностически эффективным малоинвазивным тестом при фиброзе миокарда трансплантированного сердца является комплексное исследование в плазме крови miR-27 и галектина-3.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется объемом проведенных исследований (188 образцов плазмы крови, полученных от 152 пациентов; более 1000 молекулярно-генетических и 300 иммуноферментных тестов) с использованием современных и стандартизированных методов исследования и статистической обработки.

Работа выполнена в рамках государственных заданий Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по темам: «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» (2018-2020 гг.), «Разработка путей повышения эффективности трансплантации легких как радикального метода лечения терминальных стадий хронических респираторных заболеваний у взрослых и детей» (2018-2020 гг.); гранта Президента Российской Федерации (2020-2021 гг.) для государственной поддержки ведущих научных школ по теме: «Молекулярно-генетические маркеры структурного и функционального ремоделирования трансплантата сердца, легкого и разработка персонифицированных подходов к лечению сердечной, легочной недостаточности у реципиентов» НШ-2598.2020.7.

Апробация работы состоялась 15 октября 2021 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, кафедры трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского 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 автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на 17 Международном конгрессе Европейского общества трансплантологов (ESOT, Брюссель, Бельгия, 2015 г.), VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016 г.), III Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2017 г.), IX Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2018 г.), IV Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019 г.), X Всероссийском съезде трансплантологов с международным участием (Москва, 2020 г.), 20 Международном конгрессе Европейского общества трансплантологов (ESOT, Милан, Италия, 2021 г.), Конференции «Информационные технологии для персонализированной медицины» (Москва, 2021 г.), V Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2021 г.), Российском национальном конгрессе кардиологов (Санкт-Петербург, 2021).

Внедрение в практику

Результаты исследования используются в кардиологическом отделении и лаборатории иммунологического мониторинга федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; в учебном процессе на кафедре трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет); в лечебно-диагностической работе Государственного автономного

учреждения здравоохранения Свердловской области «Свердловская областная клиническая больница № 1».

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в определении общей концепции, задач, планировании и проведении исследования, получении научных данных, их статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 34 научные работы, из них 11 статей в российских и зарубежных журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, 6 патентов на изобретения и 2 положительных решения Федеральной службы по интеллектуальной собственности (Роспатент) о выдаче патентов на изобретения.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной характеристике пациентов и методам исследования, 5 глав с изложением результатов собственных исследований, обсуждения, 10 выводов, практических рекомендаций и указателя используемой литературы, включающего 238 источников, из них 46 отечественных и 192 зарубежных. Работа изложена на 212 страницах машинописного текста, иллюстрирована 51 таблицами и 47 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включены 152 пациента в возрасте от 4 до 74 (в среднем 42 ± 13) лет, из них 105 (69%) – мужчин и 47 (31%) – женщин, среди них 83 пациента с хронической сердечной недостаточностью, которым в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» была выполнена ортотопическая трансплантация сердца. Кроме того, обследованы 69 пациентов с хронической дыхательной недостаточностью и 12 здоровых лиц, достоверно не отличавшихся по возрасту и гендерной принадлежности от основной группы.

Отбор больных, их обследование и лечение проводились в специализированных отделениях НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова: кардиологическом отделении (зав. отделением – д.м.н. Н.Н. Колоскова), отделениях кардиохирургических № 1 (зав. отделением – д.м.н., профессор Р.Ш. Саитгареев), № 3 (зав. отделением – д.м.н. В.М. Захаревич) и хирургическом отделении №3 (зав. отделением – к.м.н. И.В. Пашков).

Все пациенты, имеющие показания к трансплантации сердца, 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, общеклинический и биохимический анализ крови, определение концентрации такролимуса, суточное мониторирование артериального давления, эхокардиографическое исследование, вирусологическое и бактериологическое исследования, биопсию миокарда, ежегодное коронароангиографическое исследование.

Стандартная схема иммуносупрессивной терапии у реципиентов сердца после трансплантации состояла из сочетания следующих препаратов: ингибиторов кальциневрина (такролимус), цитостатиков (микофенолат мофетил или микофеноловая кислота) и преднизолона. Дозы препаратов подбирались индивидуально, при этом дозировка преднизолона рассчитывалась с учетом сроков, прошедших после трансплантации, и наличия эпизодов отторжения трансплантата в анамнезе.

Пациенты с хронической дыхательной недостаточностью проходили плановое обследование в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества, которое включало физикальное исследование, оценку динамики изменений общих и биохимических показателей крови, общего анализа мочи и коагулограммы. Инструментальные методы исследования включали: компьютерную томографию и рентгенографию органов грудной клетки, электро- и эхокардиографию, бронхоскопию и спирометрию для оценки функции внешнего дыхания.

Верификация острого отторжения и фиброза миокарда трансплантированного сердца осуществлялась по данным исследования образцов эндомиокардиальных биоптатов. ЭМБ проводилась в отделении рентгенохирургических методов диагностики и лечения (зав. отделением д.м.н., профессор Б.Л. МIRONKOV) путем трансвенозного доступа из полости правого желудочка сердца. Процедура проводилась в раннем послеоперационном периоде и после выписки пациента из стационара, согласно протоколу ведения реципиентов сердца, или по показаниям в соответствии с рекомендациями Российского трансплантологического общества. Полученный материал подлежал дальнейшему гистологическому и иммуногистохимическому исследованию в патологоанатомическом отделении (зав. отделением д.м.н. Н.П. Можейко).

На основании коронароангиографического исследования выявлялось стенотическое поражение коронарных артерий и оценивались локализация и степень сужения в каждой из ветвей. Коронароангиография выполнялась ежегодно или по показаниям в отделении рентгенохирургических методов диагностики и лечения (зав. отделением д.м.н., профессор Б.Л. МIRONKOV).

Материалом для исследования уровня циркулирующих микроРНК и концентрации протеомных биомаркеров служили образцы периферической крови пациентов, которые собирали в одноразовые пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (ЭДТА), от 1 до 4-х (в среднем 1,22) образцов от каждого пациента.

Уровень экспрессии панели из пяти микроРНК (miR-101, miR-142, miR-27, miR-339 и miR-424) измеряли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с помощью наборов реагентов SerumPlasma (Qiagen, США). Интенсивность экспрессии микроРНК рассчитывалась по $2^{-\Delta CT}$ методу и выражалась в относительных единицах,

эквивалентных $\log_2 (2^{-\Delta C_t})$, где ΔC_t – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39.

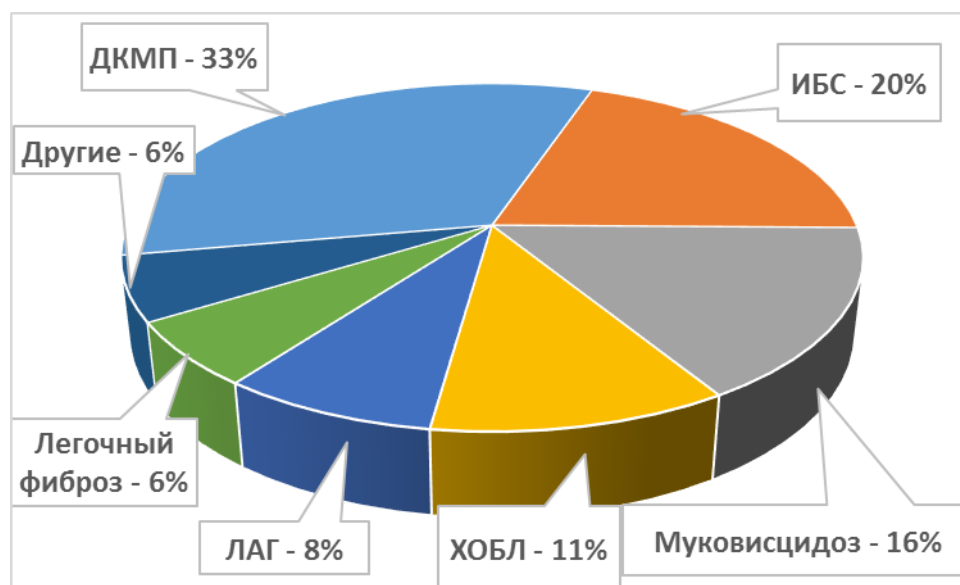
Определение концентрации протеомных биомаркеров – ST2, галектина-3, VEGF-A, PlGF, MCP-1 и sCD40L, проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов Critical Diagnostics Presage® ST2 Assay (США), Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия), Simplex ProcartaPlex™ (Affymetrix, США).

Статистический анализ результатов настоящей работы проведен с помощью статистического пакета программ Statistica v. 13.0 (StatSoftInc, США) и MEDCALC 12.7.5.0 (MedCalc software, Бельгия). Выбор статистических критериев (непараметрической статистики) обусловлен типом анализируемых данных (при сравнении независимых переменных применялся U-критерий Манна-Уитни). Для оценки связи качественных и количественных порядковых признаков рассчитывался коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Значения непараметрических данных выражены медианой и интерквартильным размахом [25%-75%]. Показатели параметрических данных представлены в виде верхней и нижней границы 95%-ого доверительного интервала (95% ДИ). Для всех критериев и тестов двусторонний уровень обозначения статистической значимости выбран $p < 0,05$.

Результаты исследования

Анализ уровня экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов с хронической сердечной и дыхательной недостаточностью

У пациентов с хронической сердечной недостаточностью (64 мужчины и 19 женщин, возраст от 16 до 71, 48 ± 11 лет) основными заболеваниями, определившими показания к ТС, стали: дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) – у 50 (60%) пациентов; ишемическая болезнь сердца (ИБС) – у 30 (36%) пациентов; прочие патологии – у 3 (4%) пациентов, в том числе гипертрофическая кардиомиопатия и приобретенные пороки сердца. Группы сравнения составили 69 пациентов с хронической дыхательной недостаточностью (41 мужчин и 28 женщин, возраст от 4 до 74, 35 ± 13 лет), основными заболеваниями у которых были: у 25 (36%) пациентов - муковисцидоз, у 17 (25%) - хроническая обструктивная болезнь легких и эмфизема, у 12 (17%) - легочная артериальная гипертензия, у 9 (13%) - легочный фиброз различной этиологии и у 6 (9%) пациентов - прочие патологии, среди которых бронхоэктатическая болезнь легких и лимфангиолейомиоматоз (Рисунок 1). А также здоровые лица ($n=12$), достоверно не отличающиеся по возрасту и гендерной принадлежности от основной группы.



Примечание: ДКМП - дилатационная кардиомиопатия, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, ЛАГ - легочная артериальная гипертензия

Рисунок 1 – Распределение основных заболеваний, послуживших причиной развития хронической сердечной или дыхательной недостаточности

У пациентов с хронической сердечной недостаточностью уровень экспрессии трех из пяти исследуемых микроРНК – miR-27, miR-339 и miR-424

оказался достоверно выше, чем у здоровых лиц ($p=0,05$, $p=0,0001$ и $p=0,003$ соответственно) (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК у пациентов, страдающих хронической сердечной недостаточностью, и здоровых лиц

МикроРНК (отн. ед.)	Здоровые лица	Пациенты с ХСН	Достоверность, p
miR-101	-5,66 [-6,85; -4,97]	-4,29 [-6,86; -3,21]	0,08
miR-142	-7,39 [-10,26; -6,36]	-7,35 [-8,19; -6,25]	0,77
miR-27	-6,40 [-7,29; 5,24]	-5,30 [-6,37; -1,22]	0,05
miR-339	-11,14 [-11,75; -11,03]	-6,06 [-7,89; -4,86]	0,0001
miR-424	-8,30 [-9,34; -7,41]	-5,46 [-7,54; -1,46]	0,003

У пациентов с хронической сердечной недостаточностью уровень экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 не различался у мужчин и женщин ($p=0,93$, $p=0,98$, $p=0,63$, $p=0,97$ и $p=0,26$ соответственно). Показатели экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 не зависели от возраста пациентов ($r=-0,304$, $p=0,16$; $r=-0,236$, $p=0,35$; $r=-0,361$, $p=0,08$; $r=0,146$, $p=0,44$ и $r=-0,054$, $p=0,82$ соответственно).

Выявленные особенности профиля экспрессии микроРНК не являются специфическими для сердечно-сосудистых заболеваний: величина экспрессии miR-27, miR-339, miR-424 у потенциальных реципиентов легких также превышает уровень у здоровых лиц (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК у пациентов, страдающих хронической дыхательной недостаточностью, и здоровых лиц

МикроРНК (отн. ед.)	Здоровые лица	Пациенты с ХДН	Достоверность, p
miR-101	-5,66 [-6,85; -4,97]	-4,66 [-6,49; -4,03]	0,056
miR-142	-7,39 [-10,26; -6,36]	-6,69 [-8,14; -4,77]	0,29
miR-27	-6,40 [-7,29; 5,24]	-3,83 [-5,46; -2,77]	0,003
miR-339	-11,14 [-11,75; -11,03]	-6,36 [-10,01; -3,30]	0,01
miR-424	-8,3 [-9,34; -7,41]	-6,75 [-8,37; -5,50]	0,04

Уровень экспрессии пяти исследуемых микроРНК – miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 в плазме крови потенциальных реципиентов сердца и потенциальных реципиентов легких достоверно не различался ($p=0,63$, $p=0,26$, $p=0,52$, $p=0,81$ и $p=0,051$ соответственно).

Достоверных различий в уровне экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-424 в зависимости от исходного диагноза: дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) и ишемическая болезнь сердца (ИБС), послужившего причиной развития хронической сердечной недостаточности не выявлено ($p=0,6$, $p=0,52$, $p=0,57$ и $p=0,12$ соответственно). Уровень экспрессии miR-339 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, причиной развития которой была ишемическая болезнь сердца, был достоверно выше, чем у пациентов, у которых была диагностирована дилатационная кардиомиопатия (Рисунок 2).

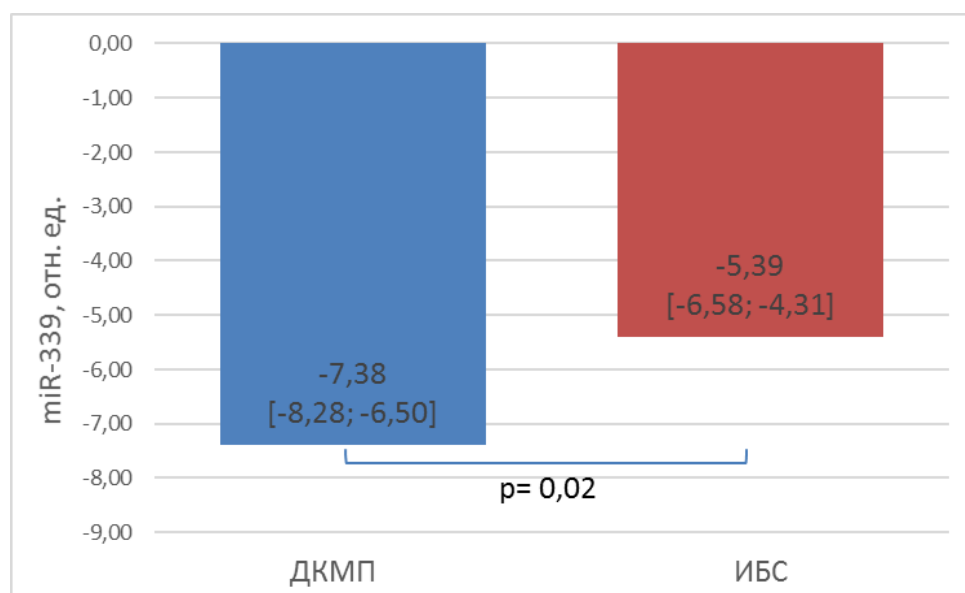


Рисунок 2 – Уровень экспрессии miR-339 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью в зависимости от исходного диагноза: ДКМП и ИБС

Проведен анализ корреляционной связи уровня экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 в плазме крови пациентов, страдающих хронической сердечной недостаточностью, с содержанием следующих протеомных биомаркеров, значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений: стимулирующий фактор роста (ST2), галектин-3, фактор роста эндотелия сосудов-A (VEGF-A), плацентарный фактор роста (PLGF), хемоаттрактантный белок макрофагов (MCP-1), растворимая форма лиганда CD40 (sCD40L).

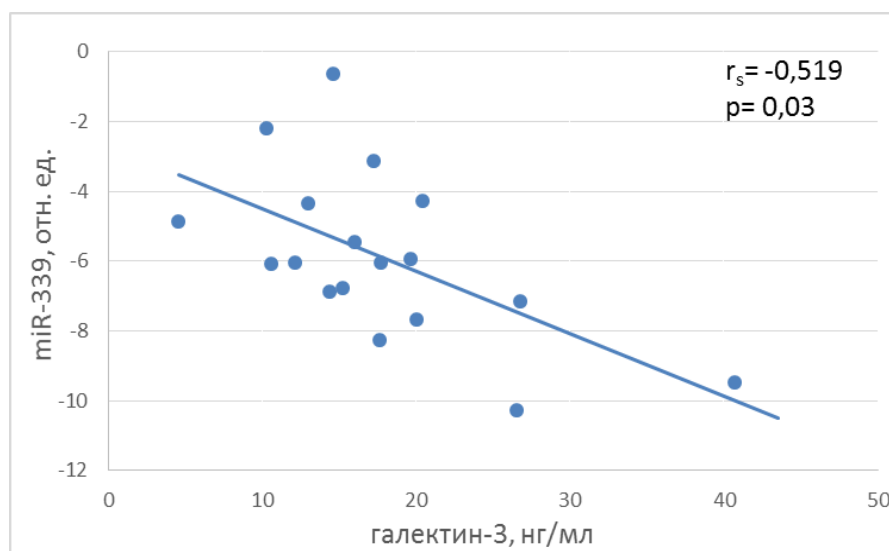


Рисунок 3 – Корреляционная связь уровня экспрессии miR-339 и концентрации галактина-3 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Установлено, что величина экспрессии miR-339 имела обратную корреляцию с концентрацией галактина-3 ($r=-0,519$, $p=0,03$). Уровень экспрессии miR-101 имел прямую корреляцию с концентрацией PLGF-1, а уровень экспрессии miR-27 – обратную корреляцию с концентрацией MCP-1 ($r=0,783$, $p=0,01$ и $r=-0,717$, $p=0,03$ соответственно) (Рисунок 3).

Результаты, представленные в настоящем разделе, показывают, что у потенциальных реципиентов сердца величина экспрессии miR-27, miR-339, miR-424 достоверно выше в сравнении со здоровыми. Выявленные особенности профиля экспрессии микроРНК не являются специфическими для сердечно-сосудистых заболеваний: достоверное увеличение экспрессии тех же микроРНК – miR-27, miR-339, miR-424 в сравнении со здоровыми лицами выявлено у больных с хронической дыхательной недостаточностью. Более того, величина этих показателей у больных сердечной и дыхательной недостаточностью достоверно не различается. Уровни экспрессии исследованных микроРНК не зависят от пола и возраста потенциальных реципиентов сердца. Величина экспрессии miR-339 достоверно выше у потенциальных реципиентов сердца, причиной развития тяжелой хронической сердечной недостаточности у которых явилась ишемическая болезнь сердца, нежели у больных с дилатационной кардиомиопатией. Установлено, что величина экспрессии микроРНК в плазме крови потенциальных реципиентов сердца коррелирует с концентрацией протеомных биомаркеров: воспаления – MCP-1 (miR-27), фиброза – галактин-3 (miR-339) и неоангиогенеза – PLGF (miR-101).

***Анализ уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов сердца
в ранние и отдаленные сроки после трансплантации***

Период наблюдения реципиентов сердца после трансплантации включал: ранний период – первый месяц после ТС (медиана 35 [15; 69] суток) и отдаленный период – спустя год и более после ТС (медиана 404 [346,7; 783,5] суток).

У реципиентов сердца в ранние сроки после трансплантации уровень экспрессии miR-101, miR-339 и miR-424 достоверно ниже, чем у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ($p=0,05$, $p=0,009$ и $p=0,02$ соответственно) (Таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца в ранние сроки после трансплантации

МикроРНК (отн. ед.)	Пациенты с ХСН	Реципиенты сердца (ранние сроки после ТС)	Достоверность, p
miR-101	-4,29 [-6,86; -3,21]	-6,41 [-9,09; -3,73]	0,05
miR-142	-7,35 [-8,19; -6,25]	-7,03 [-8,35; -6,01]	0,89
miR-27	-5,3 [-6,37; -1,22]	-5,28 [-6,24; -3,56]	0,93
miR-339	-6,06 [-7,89; -4,86]	-9,91 [-11,29; -5,94]	0,009
miR-424	-5,46 [-7,54; -1,46]	-7,21 [-8,25; -6,13]	0,02

При этом величина экспрессии всех пяти микроРНК – miR-101, miR-142, miR-27, miR-339 и miR-424 у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации достоверно не различалась (Таблица 4).

Таблица 4 – Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации

МикроРНК (отн. ед.)	Реципиенты сердца (ранние сроки после ТС)	Реципиенты сердца (отдаленные сроки после ТС)	Достоверность, р
miR-101	-6,41 [-9,09; -3,73]	-6,03 [-7,27; -4,47]	0,25
miR-142	-7,03 [-8,35; -6,01]	-6,52 [-7,39; -5,09]	0,19
miR-27	-5,28 [-6,24; -3,56]	-3,29 [-5,16; -1,65]	0,06
miR-339	-9,91 [-11,29; -5,94]	-9,02 [-10,56; -5,80]	0,44
miR-424	-7,21 [-8,25; -6,13]	-6,41 [-7,60; -5,50]	0,13

У реципиентов сердца уровень экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 не различался у мужчин и женщин ($p=0,69$, $p=0,15$, $p=0,87$, $p=0,35$ и $p=0,06$ соответственно). Показатели экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 не зависели от возраста реципиентов ($r=-0,155$, $p=0,21$; $r=-0,166$, $p=0,27$; $r=-0,079$, $p=0,52$; $r=-0,069$, $p=0,58$ и $r=-0,114$, $p=0,36$ соответственно). Не выявлено достоверных различий в уровне экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 у реципиентов сердца в зависимости от исходного диагноза: дилатационная кардиомиопатия и ишемическая болезнь сердца, послужившего причиной развития хронической сердечной недостаточности ($p=0,88$, $p=0,92$, $p=0,45$, $p=0,73$ и $p=0,38$ соответственно).

При изучении связи величины экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 в плазме крови реципиентов сердца после трансплантации с биохимическими показателями крови установлено, что miR-101 имел обратную корреляцию с содержанием аспартатаминотрансферазы ($r=-0,629$, $p=0,004$); miR-27 – с содержанием аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы ($r=-0,457$, $p=0,049$; $r=-0,507$, $p=0,027$; $r=-0,618$, $p=0,043$ соответственно); miR-339 имел прямую корреляционную связь с содержанием мочевины ($r=0,474$, $p=0,040$). При этом уровень экспрессии всех пяти исследуемых микроРНК не был связан с другими биохимическими показателями: липидного обмена, воспаления, уровнем глюкозы и др.

У реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации величина экспрессии miR-27 имела обратную корреляцию с концентрацией ST2 ($r=-0,585$, $p=0,02$). Показана прямая корреляция величины экспрессии miR-27 с концентрацией PlGF-1 и обратная корреляция величины экспрессии miR-101 с концентрацией PAPP-A ($r=0,847$, $p=0,02$ и $r=-0,557$, $p=0,05$ соответственно) (Рисунок 4).

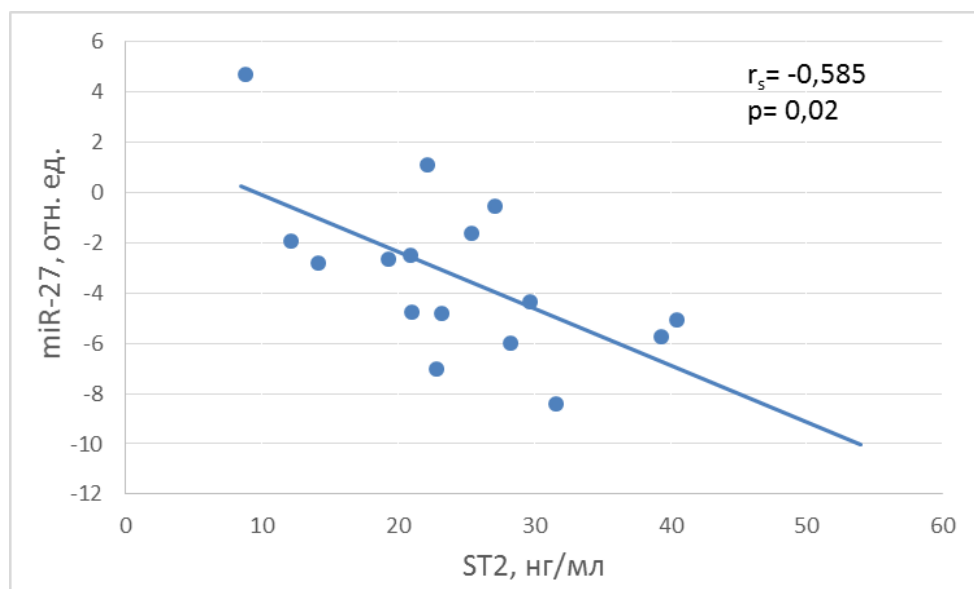


Рисунок 4 – Корреляционная связь уровня экспрессии miR-27 и концентрации ST2 у реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации

В настоящем разделе, показано, что у реципиентов сердца уровень экспрессии miR-101, miR-339 и miR-424 достоверно ниже, чем у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Величина экспрессии всех исследуемых микроРНК – miR-101, miR-142, miR-27, miR-339 и miR-424, достоверно не различается у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации. Показатели экспрессии исследованных микроРНК не зависят от пола, возраста и диагноза до трансплантации у реципиентов сердца; не связаны с большинством биохимических показателей крови. Установлено, что величина экспрессии микроРНК в плазме крови потенциальных реципиентов сердца коррелирует с концентрацией протеомных биомаркеров: отторжения – ST2 (miR-27), PAPP-A (miR-101) и неоангиогенеза – PlGF (miR-27).

Анализ диагностической значимости микроРНК и диагностической эффективности сочетания микроРНК со стимулирующим фактором роста-2 при остром отторжении трансплантированного сердца

В течение всего периода наблюдения после трансплантации признаки острого отторжения были верифицированы в эндомикардиальных биоптатах у 44 реципиентов, включенных в исследование. Среди них: острое клеточное отторжение (R1G – R3G степени по классификации ISHLT-2004) наблюдалось у 38 реципиентов, гуморальное – у 5 реципиентов и смешанное – в 1-м образце. Группу сравнения составили 27 реципиентов сердца без верифицированных признаков острого отторжения.

На рисунке 5 представлена морфологическая картина образцов эндомикардиальных биоптатов трансплантированного сердца, в которых были обнаружены признаки острого клеточного и гуморального отторжения.

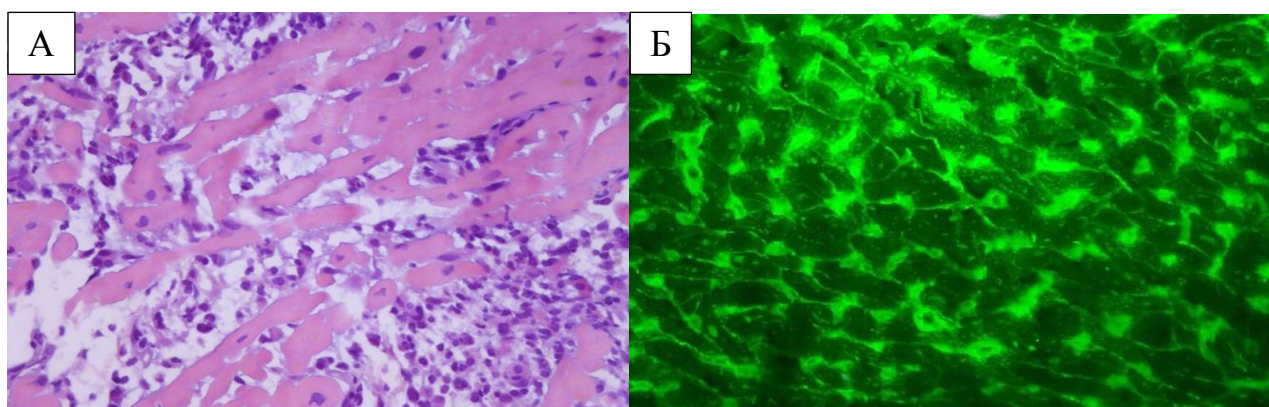


Рисунок 5 – Исследование образцов эндомикардиальных биоптатов: А - многоочаговое умеренное острое клеточное отторжение трансплантата сердца (R2G степень по классификации ISHLT-2004). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 400; Б - фиксация C4d фрагмента комплемента в стенке капилляров миокарда при остром гуморальном отторжении. Иммуногистохимическое исследование

Данные сравнительного анализа уровня экспрессии исследуемых микроРНК в плазме крови реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата и без отторжения показали, что величина экспрессии miR-101 и miR-27 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата достоверно ниже по сравнению с реципиентами без отторжения ($p=0,02$ и $p=0,01$ соответственно) (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата и без отторжения

МикроРНК (отн. ед.)	Реципиенты сердца		Достоверность, p
	без отторжения	с отторжением	
miR-101	-5,13 [-6,47; -4,18]	-6,41 [-9,14; -4,56]	0,02
miR-142	-7,02 [-8,04; -5,73]	-6,36 [-8,72; -5,11]	0,51
miR-27	-2,77 [-4,78; -0,13]	-4,98 [-6,40; -2,62]	0,01
miR-339	-10,04 [-11,2; -8,22]	-10,26 [-11,62; -9,2]	0,81
miR-424	-7,04 [-7,47; -5,79]	-7,05 [-8,27; -5,92]	0,98

Для анализа диагностической значимости miR-101 и miR-27 у реципиентов сердца в отношении острого отторжения трансплантата применен метод сравнения ROC-кривых. Площадь под ROC-кривой для miR-101 составила $0,667 \pm 0,065$ [95% ДИ 0,543 – 0,777] и достоверно ($p=0,01$) отличалась от величины 0,5; для miR-27 она так же достоверно ($p=0,005$) отличалась от 0,5 и составила $0,682 \pm 0,064$ [95% ДИ 0,561 – 0,788] (Рисунок 6).

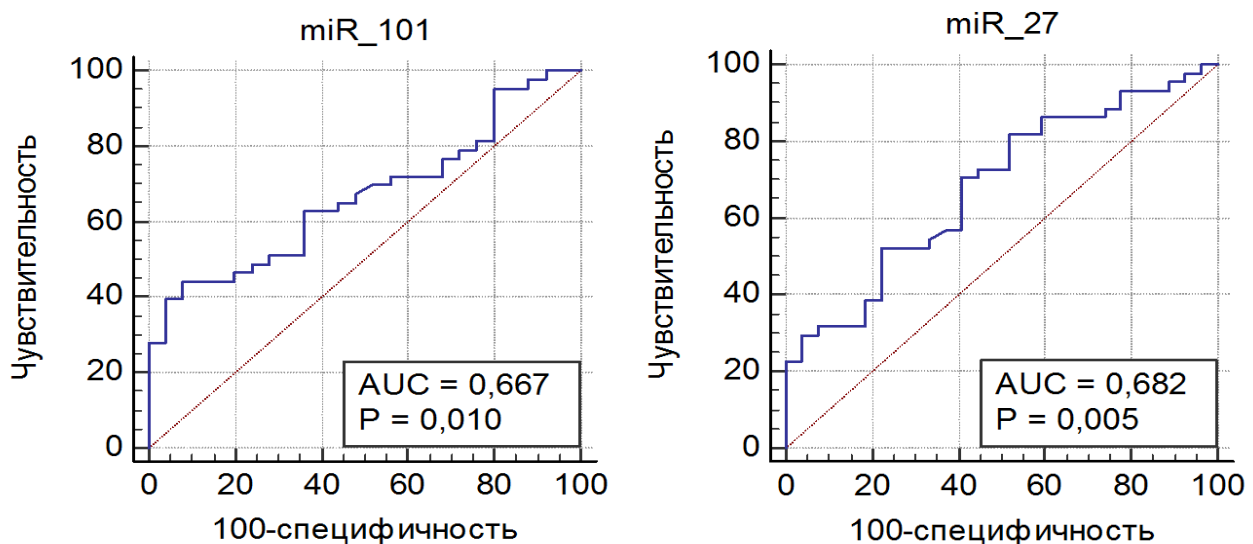


Рисунок 6 – ROC-кривая miR-101 и miR-27 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата

Пороговые уровни экспрессии miR-101 и miR-27, значимые для диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца, определялись по оптимальному сочетанию значений чувствительности и специфичности, соответствующему наибольшему показателю индекса Юдена и были установлены на уровне $\leq -8,03$ отн. ед. и $\leq -4,9$ отн. ед. соответственно (Рисунок 7).

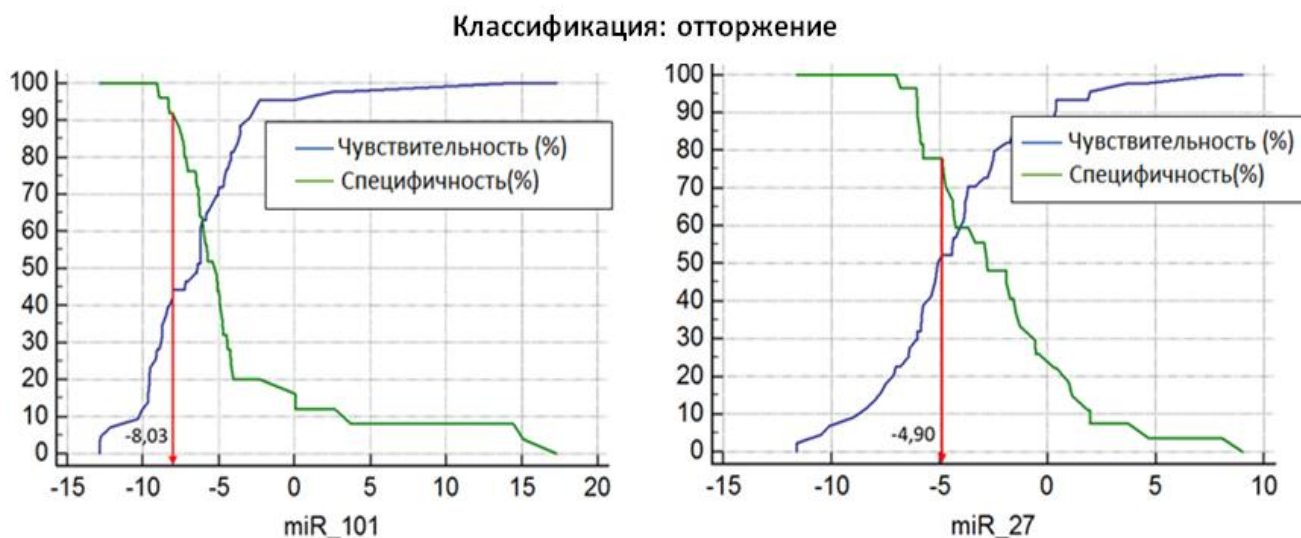


Рисунок 7 – Диагностически значимые пороговые значения уровня экспрессии miR-101 и miR-27 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата

Относительный риск выявления острого отторжения трансплантационного сердца при показателях экспрессии miR-101 ниже порогового уровня ($\leq -8,03$ отн. ед.) достоверно составил $RR=1,77 \pm 0,159$ [95% ДИ 1,296 – 2,422], $p=0,0003$; для miR-27 риск развития того же осложнения при уровне экспрессии ниже порогового значения ($\leq -4,9$ отн. ед.) составил $RR=1,59 \pm 0,181$ [95% ДИ 1,112 – 2,262], $p=0,011$. При совместном определении miR-101 и miR-27 в отношении острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца было установлено, что при уровне экспрессии указанных микроРНК ниже найденных пороговых значений вероятность риска развития острого отторжения трансплантата возрастает в 1,89 раза ($RR=1,89 \pm 0,188$ [95% ДИ 1,306 – 2,732], $p=0,0007$) (Таблица 6).

Следует отметить, что все три теста обладают достаточно высокой специфичностью (от 77,8 до 92,0%) и невысокой чувствительностью (около 50%), что не позволяет рассматривать ни один из этих тестов как приемлемый для практического применения в отношении выявления острого отторжения трансплантационного сердца.

Таблица 6 – Диагностические характеристики измерения уровней экспрессии *miR-101* и *miR-27* при остром отторжении трансплантированного сердца при уровне ниже пороговых значений

МикроРНК	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	PPV	NPV	p-уровень
miR-101	1,77	[1,296 – 2,422]	44,2 %	92,0 %	90,5%	48,9%	0,0003
miR-27	1,59	[1,112 – 2,262]	52,3 %	77,8 %	79,3%	50,0%	0,011
miR-101 +miR-27	1,89	[1,306 – 2,732]	48,6 %	90,9 %	89,5%	52,6%	0,0007

RR – relative risk, относительный риск; Se – sensitivity, чувствительность; Sp – specificity, специфичность; PPV – positive predictive value, положительное прогностическое значение теста; NPV – negative predictive value, отрицательное прогностическое значение теста

В ходе настоящего исследования установлено, что концентрация ST2 в крови реципиентов с острым отторжением трансплантированного сердца достоверно выше, чем у реципиентов без отторжения 38,49 [21,90; 82,71] нг/мл и 21,72 [15,17; 29,37] нг/мл соответственно, $p=0,01$.

Диагностическая значимость ST2 у реципиентов сердца в отношении острого отторжения трансплантата определялась методом сравнения ROC-кривых. Площадь под ROC-кривой для ST2 составила $0,747 \pm 0,079$ [95% ДИ от 0,580 – 0,874] и достоверно ($p=0,002$) отличалась от величины 0,5. Диагностически значимая пороговая концентрация ST2 в отношении выявления острого отторжения трансплантированного сердца определялась по оптимальному сочетанию значений чувствительности и специфичности, соответствующему наибольшему показателю индекса Юдена, и была установлена на уровне $>36,84$ нг/мл (Рисунок 8).

Относительный риск выявления острого отторжения трансплантата при концентрации ST2 выше порогового уровня достоверно составил $RR=2,27 \pm 0,226$ [95% ДИ 1,460 – 3,537] ($p=0,0003$).

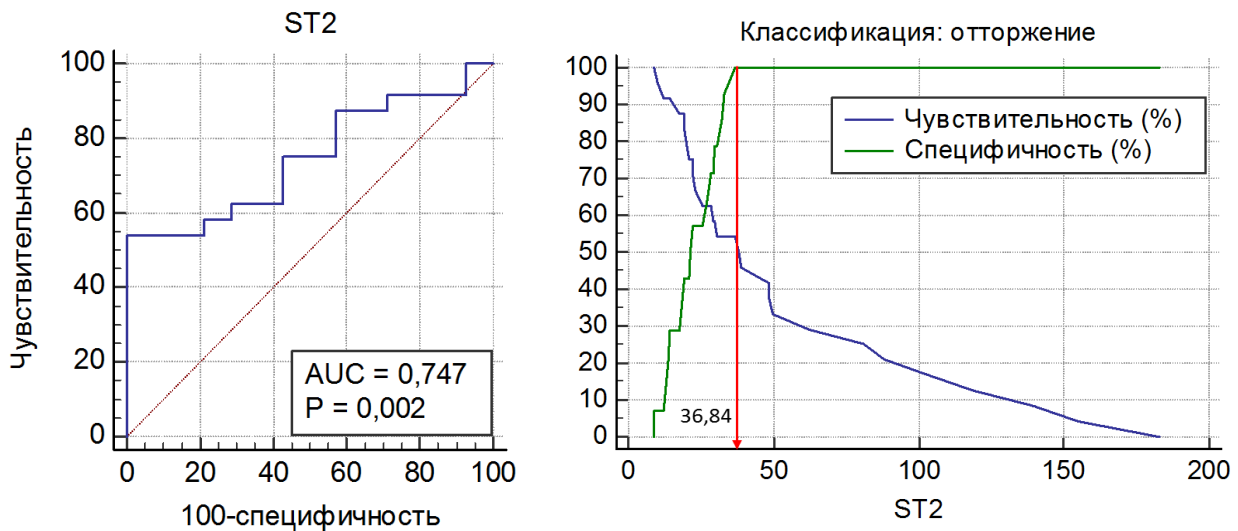


Рисунок 8 – ROC-кривая концентрации ST2 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата и диагностически значимая пороговая концентрация ST2 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата

Совместное определение уровней экспрессии miR-101, miR-27 и концентрации ST2 повышает диагностические характеристики теста – относительный риск, чувствительность, специфичность, позитивную и негативную прогностическую значимость при остром отторжении трансплантированного сердца по сравнению с определением miR-101, miR-27, ST2 по отдельности. При одновременном уровне экспрессии miR-101 ниже и концентрации ST2 выше пороговых значений, рассчитанных ранее, риск развития острого отторжения трансплантата возрастает в 3,75 раза ($RR=3,75\pm0,428$ [95% ДИ 1,620 – 8,680], $p=0,002$). При одновременном уровне экспрессии miR-27 ниже и концентрации ST2 выше пороговых значений, рассчитанных ранее, риск развития острого отторжения трансплантата возрастает в 3,00 раза ($RR=3,00\pm0,365$ [95% ДИ 1,467 – 6,137], $p=0,003$) (Таблица 7).

Таблица 7 – Диагностические характеристики совместного измерения уровней экспрессии miR-101, miR-27 ниже и концентрации ST2 выше пороговых значений при остром отторжении трансплантированного сердца

Комбинация биомаркеров	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	PPV	NPV	p-уровень
miR-101 + ST2	3,75	[1,620 – 8,680]	69,2 %	100,0 %	100,0 %	73,3 %	0,002
miR-27 + ST2	3,00	[1,467 – 6,137]	64,3 %	100,0 %	100,0 %	66,7 %	0,003

RR – relative risk, относительный риск; Se – sensitivity, чувствительность; Sp – specificity, специфичность; PPV – positive predictive value, положительное прогностическое значение теста; NPV – negative predictive value, отрицательное прогностическое значение теста

Представленные в настоящем разделе результаты показали, что у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантированного сердца, верифицированными по результатам исследования эндомиокардиального биоптата, уровень экспрессии двух из пяти исследуемых микроРНК – miR-101 и miR-27 ниже, чем у реципиентов без выявленных признаков отторжения в трансплантате. Было установлено, что совместное определение величины экспрессии микроРНК и концентрации протеомного биомаркера ST2 повышает диагностические характеристики теста в отношении выявления острого отторжения трансплантированного сердца. Наибольшей диагностической эффективностью обладал комплексный тест на miR-101 и ST2, при котором относительный риск выявления острого отторжения трансплантата возрастал в 3,75 раза ($RR=3,75\pm0,428$ [95% ДИ 1,620 – 8,680], $p=0,002$) при показателях чувствительности и специфичности равных 69,2% и 100% соответственно.

Анализ диагностической значимости микроРНК при стенотическом поражении коронарных артерий трансплантированного сердца

В настоящее исследование включено 53 реципиентов сердца, среди которых у 39 включенных в настоящее исследование реципиентов сердца по данным коронароангиографии (КАГ) гемодинамически значимого стенотического поражения коронарных артерий выявлено не было. У 4-х реципиентов выявлено стенотическое поражение эпикардиальных коронарных артерий менее 50%. У 10-ти реципиентов выявлено гемодинамически значимое стенотическое поражение эпикардиальных коронарных артерий – более 50% просвета. Среди них четверем реципиентам была выполнена чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика (ЧТКА) в раннем посттрансплантационном периоде, в шести случаях от выполнения ЧТКА было принято клинически обоснованное решение воздержаться.

При сравнении групп реципиентов с различной степенью поражения коронарных артерий донорского сердца достоверных различий в отношении пола, возраста, исходного диагноза, наличия сахарного диабета и артериальной гипертензии в анамнезе выявлено не было. Уровень экспрессии всех пяти микроРНК – miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424, в плазме крови до трансплантации достоверно не различался

в группах реципиентов с гемодинамически значимым стенотическим поражением коронарных артерий трансплантата и без такового (Таблица 8).

Таблица 8 – Сравнительная характеристика реципиентов в зависимости от степени поражения коронарных артерий донорского сердца

Параметры		Число пациентов, n (%)		Достоверность различий, p
		Стенотическое поражение КА отсутствует или менее 50% (n=43)	Стенотическое поражение КА более 50% (n=10)	
Пол, мужской		37 (86%)	6 (60%)	0,06
Возраст, лет: <i>диапазон вариаций</i> <i>ср.знач. ± ст.откл.</i>		от 16 до 71 48±12	от 26 до 58 48±8	0,81
Исходный диагноз	ДКМП	23 (53%)	6 (60%)	0,77
	ИБС	18 (42%)	4 (40%)	
	Другие	2 (5%)		
Сахарный диабет		4 (9%)	1 (10%)	0,95
АГ в анамнезе		9 (21%)	4 (40%)	0,21
miR-101, отн. ед.		-7,59 [-10,27; -6,54]	-6,52 [-7,65; -5,39]	0,57
miR-142, отн. ед.		-7,33 [-7,84; -6,72]	-8,57 [-8,71; -8,42]	0,07
miR-27, отн. ед.		-6,17 [-8,36; -5,85]	-7,03 [-8,86; -5,62]	0,96
miR-339, отн. ед.		-6,05 [-7,54; -4,86]	-4,34 [-5,93; -4,30]	0,37
miR-424, отн. ед.		-5,90 [-7,98; 2,67]	-3,99 [-5,26; -2,73]	0,71

Примечание: ДКМП - дилатационная кардиомиопатия, ИБС – ишемическая болезнь сердца, АГ - артериальная гипертензия

В дальнейшем оценивалась динамика прогрессирования стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца. Оценка производилась по результатам выполнения серии контрольных КАГ исследований во время планового стационарного обследования спустя $441 \pm 182,06$ дней и $1072 \pm 342,2$ дней после трансплантации.

По результатам выполненного КАГ исследования спустя $441 \pm 182,06$ дней было выявлено, что у 6 пациентов (в 13,9%) группы без стенотического поражения КА или со стенотическим поражением КА менее 50% (по данным первичной КАГ) развивается стенотическое поражение коронарных артерий трансплантированного сердца. У троих реципиентов сердца (в 30,0% случаев) из группы со стенотическим поражением КА более 50% (по данным первичной КАГ) было отмечено прогрессирование стеноза коронарных артерий трансплантированного сердца. Через $1072 \pm 342,2$ дней все пациенты, участвующие в исследовании, также проходили контрольное КАГ исследование. В первой группе пациентов – без стенотического поражения КА, либо со стенозом КА $<50\%$, отмечалась следующая закономерность: у 10 реципиентов сердца (в 23,3% случаев) отмечено дальнейшее прогрессирование стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца. У 6 пациентов (в 60,0% случаев) второй группы, со стенотическим поражением КА $>50\%$, отмечено увеличение распространенности поражения коронарных артерий трансплантированного сердца (Таблица 9).

Таблица 9 – Сравнительная характеристика динамики развития стенотического поражения коронарных артерий трансплантата

Срок после ТС (дни)	Доля реципиентов с исходно выявленными изменениями коронарных артерий трансплантата (%)		Достоверность различий, р
	Стенотическое поражение КА отсутствует или менее 50%	Стенотическое поражение КА более 50%	
441±182,06 дней	13,9	30,0	0,230
1072±342,2 дней	23,3	60,0	0,023

Результаты анализа показали, что развитие и прогрессирование стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца отмечается у всех реципиентов, вне зависимости от исходного состояния коронарного русла донорского сердца, однако чаще всего развитие стеноза регистрируется у пациентов с исходным гемодинамически значимым стенотическим поражением коронарных артерий.

Данные сравнительного анализа уровня экспрессии исследуемых микроРНК в плазме крови реципиентов сердца со стенотическим поражением коронарных артерий трансплантата и без такового показали, что величина экспрессии miR-339 у реципиентов сердца со стенотическим поражением коронарных артерий трансплантата достоверно ниже по сравнению с реципиентами без стеноза ($p=0,038$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК у реципиентов сердца со стенотическим поражением коронарных артерий и без таковой

МикроРНК	Реципиенты сердца		Достоверность различий, р
	Без стеноза КА	Со стенозом КА	
miR-101	-7,27 [-9,07; -4,37]	-7,03 [-7,81; -5,68]	0,887
miR-142	-6,89 [-8,38; -6,30]	-6,95 [-7,67; -5,55]	0,836
miR-27	-5,93 [-7,07; -1,08]	-3,82 [-5,00; -2,84]	0,479
miR-339	-5,80 [-7,88; -1,43]	-9,22 [-9,89; -8,04]	0,038
miR-424	-7,24 [-8,62; -6,41]	-6,98 [-7,54; -6,00]	0,601

Диагностическая значимость miR-339 у реципиентов сердца в отношении стенотического поражения коронарных артерий трансплантата определялась методом сравнения ROC-кривых. Площадь под ROC-кривой для miR-339 составила $0,971 \pm 0,040$ [95% ДИ 0,691 – 1,000] и достоверно ($p < 0,001$) отличалась от величины 0,5. Диагностически значимая пороговая концентрация miR-339 в отношении выявления стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца определялась по оптимальному сочетанию значений чувствительности и специфичности, соответствующему наибольшему показателю индекса Юдена, и была установлена на уровне $\leq -7,93$ отн. ед. (Рисунок 9).

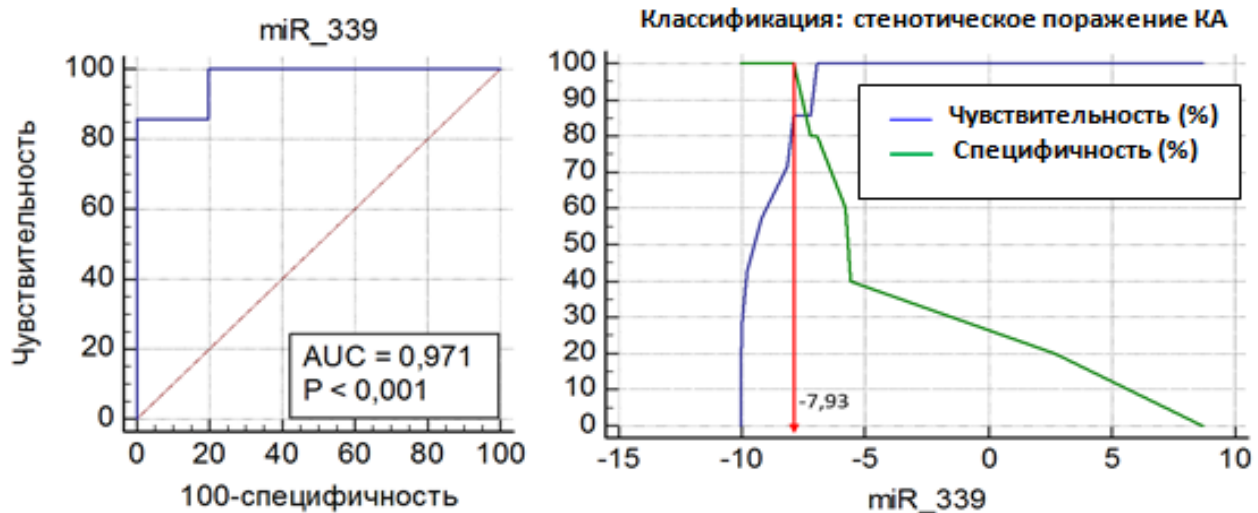


Рисунок 9 – ROC-кривая концентрации *miR-339* у реципиентов сердца со стенотическим поражением коронарных артерий трансплантата и диагностически значимая пороговая концентрация *miR-339* у реципиентов сердца со стенозом коронарных артерий трансплантата

При сравнении кривых выживаемости без нежелательных событий после трансплантации сердца в зависимости от уровня экспрессии *miR-339* выше и ниже пороговых значений, проведенного логранговым методом (log-rank), установлено, что у реципиентов сердца с величиной экспрессии *miR-339* ниже рассчитанного порогового уровня выживаемость без нежелательных событий достоверно ниже ($p=0,03$), чем у пациентов с уровнем экспрессии выше порогового значения (Рисунок 10).

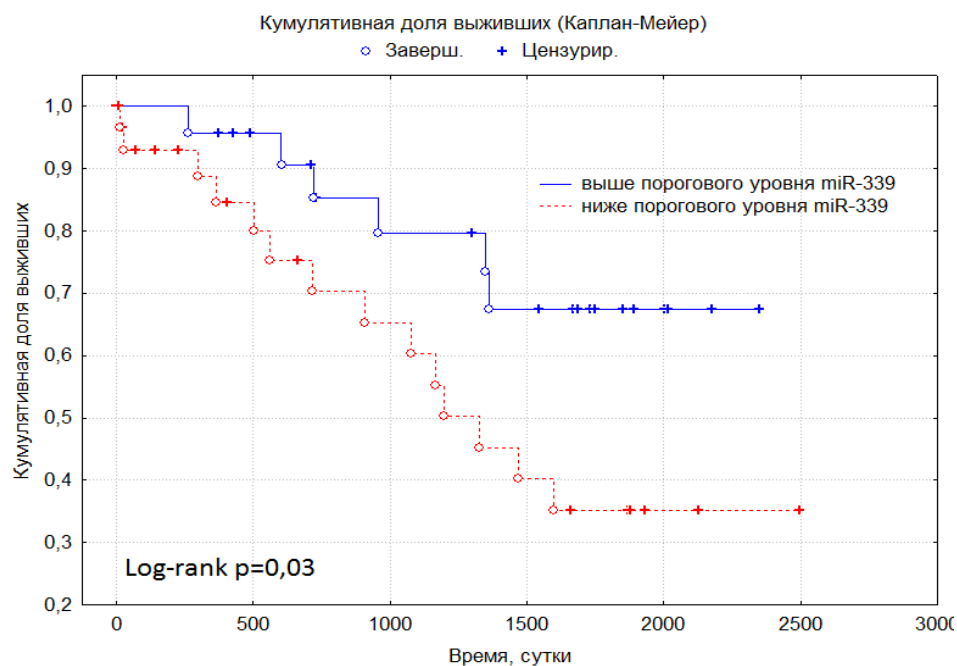


Рисунок 10 – Кривые выживаемости без нежелательных событий у реципиентов сердца с величиной экспрессии *miR-339* выше и ниже порогового уровня

Относительный риск выявления стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца при показателях экспрессии miR-339 ниже порогового уровня ($\leq -7,93$ отн. ед.) достоверно составил $RR=6,00 \pm 0,913$ [95% ДИ 1,003 – 35,909], $p=0,049$ при высоких показателях чувствительности и специфичности (Таблица 11).

Таблица 11 – Диагностические характеристики теста на miR-339 при стенотическом поражении коронарных артерий трансплантированного сердца при уровне биомаркера ниже порогового значения

МикроРНК	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	PPV	NPV	p-уровень
miR-339	6,00	[1,003 – 35,909]	85,7 %	100,0 %	100,0 %	83,3 %	0,049

RR – relative risk, относительный риск; Se – sensitivity, чувствительность; Sp – specificity, специфичность; PPV – positive predictive value, положительное прогностическое значение теста; NPV – negative predictive value, отрицательное прогностическое значение теста

Результаты, представленные в настоящем разделе, показали, что развитие и прогрессирование стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца отмечается у всех реципиентов, вне зависимости от исходного состояния коронарного русла донорского сердца. При этом чаще стеноз регистрируется у пациентов с исходным гемодинамически значимым стенотическим поражением коронарных артерий. У реципиентов сердца с развившимся стенотическим поражением коронарных артерий трансплантата, верифицированным по результатам коронароангиографии, уровень экспрессии одной из пяти исследуемых микроРНК – miR-339 ниже, чем у реципиентов без выявленного стеноза, в то время как исходно уровень miR-339, как и других микроРНК не различался у реципиентов с различной степенью поражения коронарных артерий донорского сердца. У реципиентов сердца с величиной экспрессии miR-339 ниже рассчитанного порогового значения выживаемость без нежелательных событий достоверно ниже, чем у пациентов с уровнем экспрессии выше порогового значения. При величине экспрессии miR-339 ниже порогового значения относительный риск выявления стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца в 6 раз выше, чем у остальных реципиентов.

Анализ диагностической значимости микроРНК и диагностической эффективности сочетания микроРНК с галектином-3 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца

С целью анализа связи величины уровня экспрессии исследуемых микроРНК с наличием (развитием) фибротических изменений в миокарде трансплантированного сердца в исследование включены 69 реципиентов сердца, у которых были выявлены (50 реципиентов) и не выявлены (19 реципиентов) признаки фиброза миокарда по данным исследования эндомиокардиальных биоптатов.

На рисунке 11 представлена морфологическая картина образцов эндомиокардиальных биоптатов трансплантированного сердца, в которых были обнаружены признаки фиброзе миокарда.

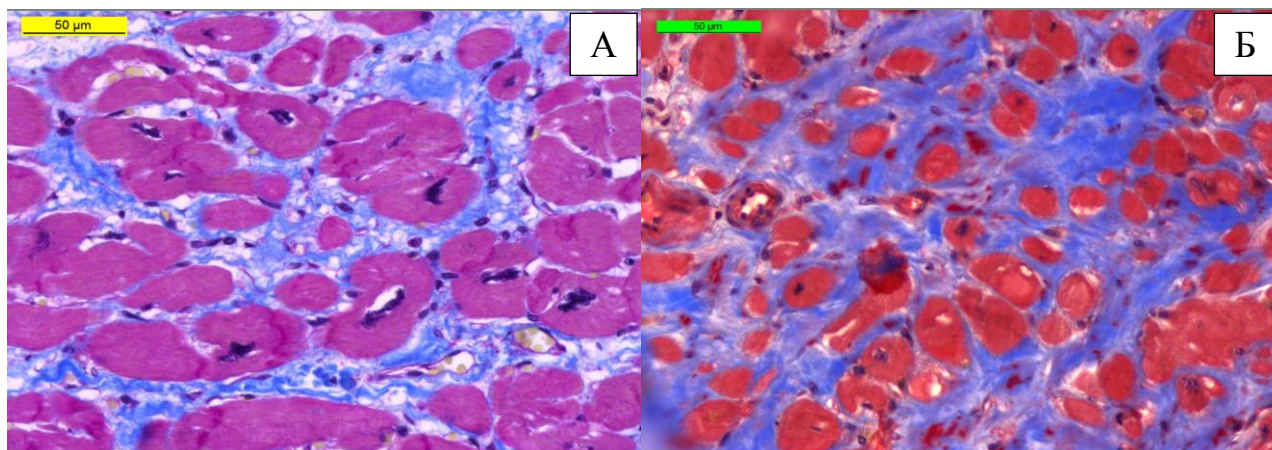


Рисунок 11 – Исследование образцов эндомиокардиальных биоптатов. Окраска Трихром по Массону, увеличение микроскопа 40: А – диффузное разрастание соединительной ткани в интерстиции. Б – очаговое разрастание соединительной ткани, очаговая дегенерация коллагеновых волокон в интерстиции

Данные сравнительного анализа уровня экспрессии исследуемых микроРНК в плазме крови реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата и без фиброза показали, что величина экспрессии miR-27 и miR-339 у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата достоверно выше по сравнению с реципиентами без такового ($p=0,018$ и $p=0,043$ соответственно) (Таблица 12).

Таблица 12 – Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК у реципиентов сердца с фиброзом миокарда и без такового

МикроРНК	Реципиенты сердца		Достоверность различий, p
	Без фиброза	С фиброзом	
miR-101	-7,629 [-8,732; -5,913]	-5,844 [-7,452; -4,467]	0,105
miR-142	-6,925 [-8,297; -5,863]	-6,226 [-8,036; -5,152]	0,409
miR-27	-5,414 [-6,430; -4,330]	-3,742 [-5,738; -1,576]	0,018
miR-339	-9,907 [-11,603; -7,784]	-7,925 [-10,132; -3,543]	0,043
miR-424	-6,532 [-7,779; -5,288]	-7,006 [-7,883; -5,617]	0,579

При анализе диагностической значимости miR-27 и miR-339 у реципиентов сердца в отношении фиброза миокарда трансплантата методом сравнения ROC-кривых установлено, что площадь под ROC-кривой для miR-27 $0,69 \pm 0,072$ [95% ДИ 0,545 – 0,828] и достоверно ($p=0,010$) отличалась от величины 0,5; для miR-339 она также достоверно ($p=0,019$) отличалась от 0,5 и составила $0,67 \pm 0,072$ [95% ДИ 0,528 – 0,812] (Рисунок 12).

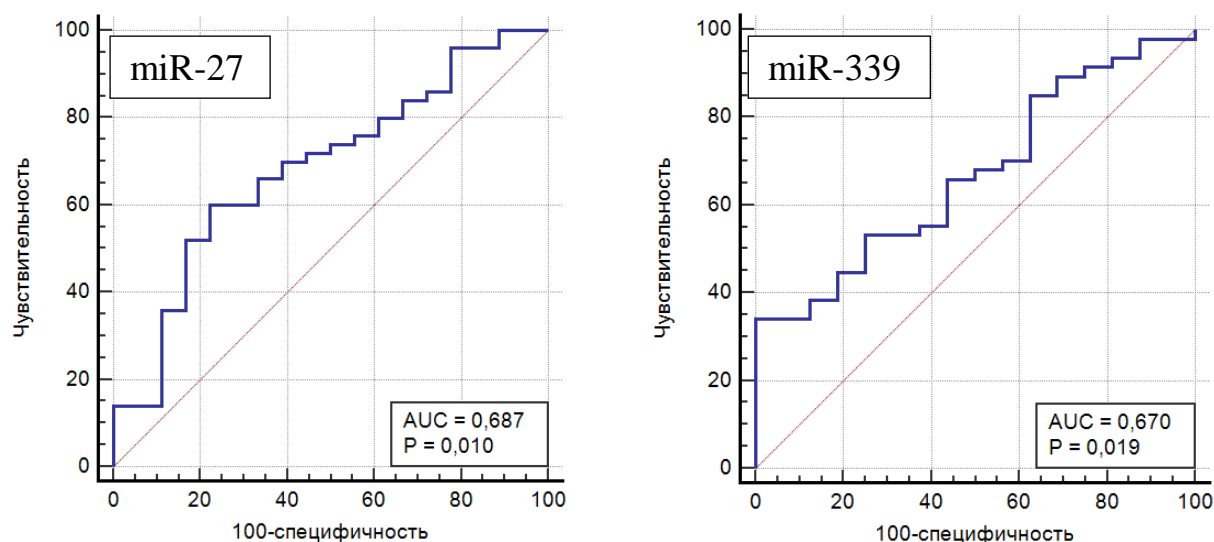


Рисунок 12 – ROC-кривая miR-27 и miR-339 у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата

Пороговые уровни экспрессии miR-27 и miR-339, значимые для диагностики фиброза миокарда трансплантата у реципиентов сердца, определялись по оптимальному сочетанию значений чувствительности

и специфичности, соответствующему наибольшему показателю индекса Юдена и были установлены на уровне $>-4,33$ отн. ед. и $>-5,24$ отн. ед. соответственно (Рисунок 13).

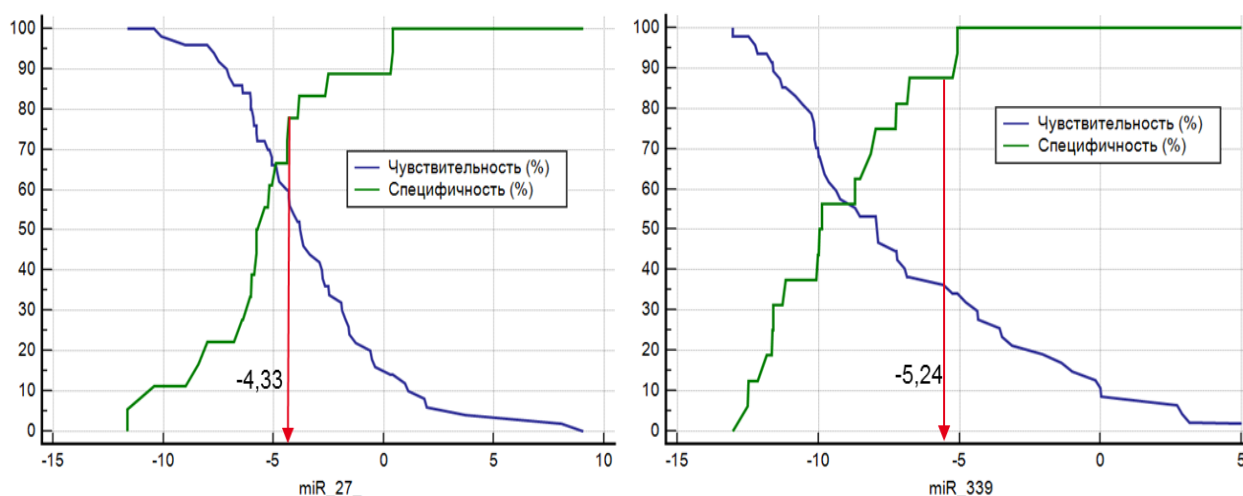


Рисунок 13 – Диагностически значимые пороговые значения уровня экспрессии *miR-27* и *miR-339* у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата

Относительный риск выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца при показателях экспрессии *miR-27* выше порогового уровня ($>-4,33$ отн. ед.) достоверно составил $RR=1,5\pm0,157$ [95% ДИ 1,104 – 2,039], $p=0,009$; для *miR-339* риск развития того же осложнения при уровне экспрессии выше порогового значения ($>-5,24$ отн. ед.) составил $RR=1,31\pm0,130$ [95% ДИ 1,018 – 1,692], $p=0,036$. При совместном определении *miR-27* и *miR-339* в отношении фиброза миокарда трансплантата у реципиентов сердца было установлено, что при уровне экспрессии указанных микроРНК выше найденных пороговых значений вероятность риска развития фиброза миокарда трансплантата возрастает в 1,93 раза ($RR=1,93\pm0,245$ [95% ДИ 1,191 – 3,111], $p=0,007$) (Таблица 13).

Однако, при высоких показателях специфичности и позитивной предсказательной значимости всех трех тестов, чувствительность и негативная предсказательная значимость как отдельных микроРНК, так и дуплексного их определения, невелика, что не позволяет рассматривать тесты на *miR-27*, *miR-339* и дуплексный тест на одновременную оценку обоих микроРНК как приемлемые для практического применения.

Таблица 13 – Диагностические характеристики *miR-27* и *miR-339* в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца при уровне выше пороговых значений

МикроРНК	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	PPV	NPV	p-уровень
miR-27	1,50	[1,104 – 2,039]	60,0 %	77,8 %	88,2 %	41,2 %	0,009
miR-339	1,31	[1,018 – 1,692]	36,2 %	87,5 %	89,5 %	31,8 %	0,036
miR-27+ miR-339	1,93	[1,191 – 3,111]	52,4 %	91,7 %	91,7 %	52,4 %	0,007

RR – relative risk, относительный риск; *Se* – sensitivity, чувствительность; *Sp* – specificity, специфичность; *PPV* – positive predictive value, положительное прогностическое значение теста; *NPV* – negative predictive value, отрицательное прогностическое значение теста

В ходе настоящего исследования установлено, что концентрация галектина-3 в крови реципиентов с фиброзом миокарда трансплантированного сердца достоверно выше, чем у реципиентов без фиброза 22,42 [19,28; 29,34] нг/мл и 18,65 [12,01; 21,35] нг/мл соответственно, $p=0,01$.

Диагностическая значимость галектина-3 у реципиентов сердца в отношении фиброза миокарда трансплантата определялась методом сравнения ROC-кривых. Площадь под ROC-кривой для галектина-3 составила $0,73 \pm 0,077$ [95% ДИ от 0,574 – 0,879] и достоверно ($p=0,004$) отличалась от величины 0,5. Диагностически значимая пороговая концентрация галектина-3 в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца определялась по оптимальному сочетанию значений чувствительности и специфичности, соответствующему наибольшему показателю индекса Юдена, и была установлена на уровне $>21,66$ нг/мл (Рисунок 14).

Относительный риск выявления фиброза миокарда трансплантата при концентрации галектина-3 выше порогового уровня достоверно составил $RR=1,46 \pm 0,157$ [95% ДИ 1,071 – 1,978] ($p=0,016$).

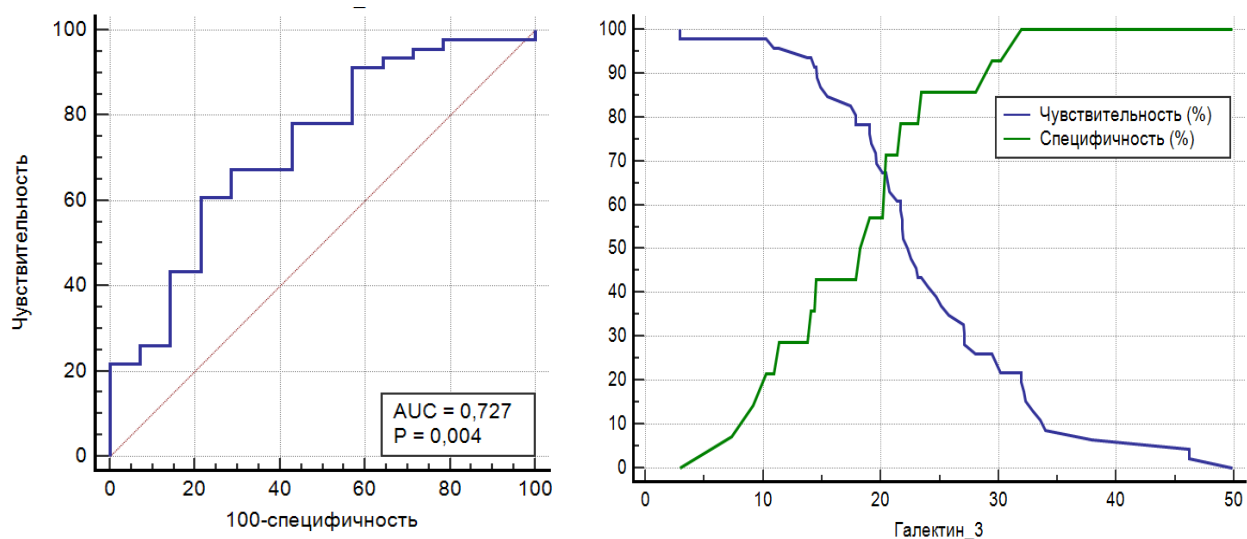


Рисунок 14 – ROC-кривая концентрации галектина-3 у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата и диагностически значимая пороговая концентрация галектина-3 у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата

Совместное определение уровней экспрессии miR-27, miR-339 и концентрации галектина-3 повышает диагностические характеристики теста – относительный риск, чувствительность, специфичность, позитивную и негативную прогностическую значимость при фиброзе миокарда трансплантированного сердца по сравнению с определением miR-27, miR-339, галектина-3 по отдельности. При одновременном уровне экспрессии miR-27 и концентрации галектина-3 выше пороговых значений, рассчитанных ранее, риск развития фиброза миокарда трансплантата возрастает в 2,67 раза ($RR=2,67+0,456$ [95% ДИ 1,090 – 6,524], $p=0,032$). При одновременном уровне экспрессии miR-339 и концентрации галектина-3 выше пороговых значений, рассчитанных ранее, риск развития фиброза миокарда трансплантата возрастает в 2,00 раза ($RR=2,00+0,316$ [95% ДИ 1,076 – 3,717], $p=0,028$) (Таблица 14).

Таблица 14 – Диагностические характеристики совместного измерения уровней экспрессии miR-27 и miR-339 и концентрации галектина-3 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца при уровне выше пороговых значений

Комбинация биомаркеров	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	PPV	NPV	p-уровень
miR-27+галектин-3	2,67	[1,090 – 6,524]	66,7 %	100,0 %	100,0 %	62,5 %	0,032
miR-339+галектин-3	2,00	[1,076 – 3,717]	54,5 %	100,0 %	100,0 %	50,0 %	0,028

RR – relative risk, относительный риск; Se – sensitivity, чувствительность; Sp – specificity, специфичность; PPV – positive predictive value, положительное прогностическое значение теста; NPV – negative predictive value, отрицательное прогностическое значение теста

В настоящем разделе, показано, что у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантированного сердца, верифицированными по результатам исследования эндомиокардиального биоптата, уровень экспрессии двух из пяти исследуемых микроРНК – miR-27 и miR-339 выше, чем у реципиентов без выявленных признаков фиброза в трансплантате. Было установлено, что совместное определение величины экспрессии микроРНК и концентрации протеомного биомаркера галектина-3 повышает диагностические характеристики теста в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца. Наибольшей диагностической эффективностью обладал комплексный тест на miR-27 и галектин-3, при котором относительный риск выявления фиброза миокарда трансплантата возрастал в 2,67 раза ($RR=2,67+0,456$ [95% ДИ 1,090 – 6,524], $p=0,032$) при показателях чувствительности и специфичности равных 66,7% и 100% соответственно.

Результаты настоящей работы показали, что величина экспрессии miR-27, miR-339 и miR-424 в плазме крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью выше, чем у здоровых лиц. Изменения в профиле экспрессии микроРНК не специфичны для сердечно-сосудистых заболеваний: у пациентов с хронической дыхательной недостаточностью уровень циркулирующих miR-27, miR-339 и miR-424 также выше, чем у здоровых и не отличается от такового у потенциальных реципиентов сердца. У реципиентов сердца изменение экспрессии отдельных микроРНК в плазме крови коррелирует с патологией сердечного трансплантата, верифицированной по данным эндомиокардиальной биопсии (острое отторжение, фиброз миокарда) и коронароангиографического исследования (стенотическое поражение коронарных артерий трансплантата) и может служить основой малоинвазивных тестов для скрининга посттрансплантационных осложнений. Комплексный анализ молекулярно-генетических (микроРНК) и протеомных биомаркеров, с учетом рассчитанных диагностически значимых пороговых значений всех показателей, повышает диагностическую эффективность микроРНК при патологии сердечного трансплантата.

ВЫВОДЫ

1. У больных хронической сердечной недостаточностью профиль экспрессии микроРНК в плазме крови отличается от такового у здоровых лиц: уровень циркулирующих miR-27, miR-339, miR-424 достоверно выше ($p=0,05$, $p=0,0001$ и $p=0,003$ соответственно); выявленные особенности профиля экспрессии микроРНК не специфичны для сердечно-сосудистых заболеваний: величина экспрессии miR-27, miR-339, miR-424 у потенциальных реципиентов легких также превышает уровень у здоровых лиц и не отличается от такового у реципиентов сердца.

2. Величина экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339, miR-424 не зависит от пола и возраста потенциальных реципиентов сердца; коррелирует с концентрацией протеомных биомаркеров, значимых при развитии посттрансплантационных осложнений: галектина-3 (miR-339, miR-424), моноцитарного хемоаттрактантного белка MCP-1 (miR-27), PlGF (miR-101); уровень miR-339 у больных ИБС выше, чем у пациентов с ДКМП ($p=0,02$).

3. После трансплантации сердца уровень экспрессии miR-101, miR-339 и miR-424 в плазме крови достоверно ниже, чем у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ($p=0,05$, $p=0,009$, $p=0,02$ соответственно); величина экспрессии miR-101, miR-142, miR-27, miR-339 и miR-424 у реципиентов сердца достоверно не различается в ранние и отдаленные сроки после трансплантации.

4. Уровень циркулирующих miR-101, miR-142, miR-27, miR-339 и miR-424 у реципиентов сердца не зависит от пола, возраста и диагноза до трансплантации; коррелирует с биохимическими показателями крови: концентрацией общего белка (miR-142), мочевины (miR-27, miR-339), активностью АЛТ (miR-27), АСТ (miR-101, miR-27, miR-424), щелочной фосфатазы (miR-27); с концентрацией протеомных биомаркеров: галектина-3 (miR-142), ST2 (miR-27, miR-424), PLGF-1 (miR-27), PAPP-A (miR-101).

5. У реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата, верифицированным по данным эндомиокардиальной биопсии, достоверно ниже уровень циркулирующих miR-101 ($p=0,02$), miR-27 ($p=0,01$) и выше концентрация ST2 ($p=0,01$), чем у реципиентов без отторжения.

6. Относительный риск острого отторжения трансплантированного сердца достоверно выше у реципиентов с величиной экспрессии $\text{miR-101} \leq -8,03$ отн. ед. либо $\text{miR-27} \leq -4,9$ отн. ед. Диагностическая эффективность комплексных тестов на микроРНК и протеомный биомаркер ST2 выше, чем отдельных тестов; риск развития острого отторжения при сочетании тестов на miR-101 и ST2 составляет $\text{RR}=3,75 \pm 0,43$ [95% ДИ 1,620 – 8,680], $p=0,002$; острого клеточного отторжения – $\text{RR}=4,00 \pm 0,43$ [95% ДИ 1,712 – 9,347], $p=0,0014$.

7. У реципиентов со стенотическим повреждением коронарных артерий трансплантата, верифицированным по результатам ангиографического исследования, уровень циркулирующего miR-339 ниже, чем у реципиентов без такового, и достоверно связан с выживаемостью без нежелательных событий ($p=0,03$).

8. У реципиентов сердца с уровнем циркулирующего miR-339 ниже рассчитанного порогового значения ($-7,93$ отн. ед.) относительный риск выявления стенотического повреждения коронарных артерий в 6 раз превышает таковой у остальных реципиентов ($\text{RR}=6,00 \pm 0,913$ [95% ДИ 1,003 – 35,909], $p=0,049$).

9. У реципиентов сердца с наличием морфологических признаков фиброза миокарда трансплантата, выявляемых по данным эндомиокардиальной биопсии, уровень экспрессии в плазме крови miR-27 и miR-339 , а также концентрация галектина-3 выше ($p=0,018$, $p=0,043$, $p=0,01$ соответственно), чем у реципиентов без фибротических изменений в трансплантате.

10. У реципиентов сердца с величиной экспрессии miR-27 , miR-339 , превышающей их пороговые значения ($-4,33$ отн. ед. и $-5,24$ отн. ед. соответственно) достоверно выше относительный риск выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца. Наибольшей диагностической эффективностью при фиброзе миокарда трансплантата обладает совместное определение уровня экспрессии miR-27 и концентрации галектина-3: $\text{RR}=2,67 \pm 0,46$ [95% ДИ 1,090 – 6,524], $p=0,032$.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Контроль уровня циркулирующих микроРНК может быть полезным для оценки состояния пациентов после трансплантации сердца.

Измерение величины экспрессии miR-101 и miR-27 целесообразно применять для выявления реципиентов сердца с высоким риском развития острого отторжения трансплантата.

С целью повышения чувствительности и специфичности теста в отношении выявления реципиентов с риском острого отторжения рекомендовано сочетание тестов на miR-101 или miR-27 совместно с определением концентрации стимулирующего фактора роста ST2.

Реципиентам сердца с уровнем экспрессии miR-101 ниже -8,0 отн. ед. или miR-27 ниже -4,9 отн. ед. и концентрацией ST2 выше 36,8 нг/мл рекомендовано проведение эндомиокардиальной биопсии для верификации диагноза острого отторжения трансплантированного сердца. Использование комплексного теста на микроРНК и ST2 позволяет улучшить результаты трансплантации за счет своевременного определения показаний к внеплановой эндомиокардиальной биопсии.

Контроль уровня экспрессии miR-339 может быть использован для мониторинга развития стенотического поражения коронарных артерий трансплантированного сердца и прогноза выживаемости реципиентов без нежелательных событий. Реципиенты сердца с показателями экспрессии miR-339 ниже -7,9 отн. ед. относятся к группе высокого риска развития стенотического поражения коронарных артерий трансплантата.

В качестве эффективного неинвазивного способа диагностики фиброза миокарда сердечного трансплантата рекомендованы тесты на основе miR-27 и miR-339.

Оптимальным для использования и обладающим наилучшими диагностическими характеристиками, является дуплексный тест на основе определения величины экспрессии miR-27 и концентрации протеомного биомаркера галектина-3.

У реципиентов сердца с уровнем экспрессии miR-27 выше -4,3 отн. ед. и концентрацией галектина-3 более 21,7 нг/мл диагностируют высокий риск развития фиброза миокарда трансплантированного сердца.

Применение диагностических тестов на основе микроРНК и протеомных биомаркеров у реципиентов сердца может потенциально сократить частоту инвазивных диагностических вмешательств или частично заменить их, что расширит возможности персонализированного подхода к ранней диагностике посттрансплантационных осложнений и тактике послеоперационного ведения пациентов.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Cardiac transplant rejection correlated with non-invasive predictors: common carotid artery wall functional indices and blood levels of biomarkers. / A. Shevchenko, A. Nasyrova, **D. Velikiy** [et al.]. // Transplant International. – 2015. – Vol. 28 (Suppl. 4). – P. 254.
2. **ST2 при отторжении трансплантированного сердца.** / О.П. Шевченко, А.А. Улыбышева, **Д.А. Великий**, А.О. Шевченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. 17. – № 4. – С. 90-94.
3. ST2 у пациентов с сердечной недостаточностью и реципиентов сердца. / А.О. Шевченко, А.А. Улыбышева, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18. – № 5. – С. 56.
4. Связь концентрации биомаркеров с показателем ригидности общей сонной артерии у реципиентов сердца. / А.О. Шевченко, И.Ю. Тюняева, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18. – № 5. – С. 54-55.
5. **Великий, Д.А. МикроРНК у реципиентов сердечного трансплантата.** / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19. - № 2. – С. 126-132.
6. Величина концентрации ST2 в плазме крови связана с выраженностью морфологических признаков острого отторжения трансплантированного сердца. / О.Е. Гичкун, А.А. Улыбышева, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19. – № 5. – С. 78-79.
7. Формирование панели микро-РНК для диагностики патологии сердечного трансплантата. / О.П. Шевченко, **Д.А. Великий**, О.Е. Гичкун [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20. – № 5. – С. 49-50.
8. **Великий, Д.А., МикроРНК: роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний: перспективы клинического применения.** / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, А.О. Шевченко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63. – № 7. – С. 403-409.

9. Экспрессия молекул микроРНК у пациентов с терминальной стадией заболеваний легких различной этиологии. / О.Е. Гичкун, О.М. Цирульникова, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № S. – С. 61-62.

10. **Великий, Д.А.** Изменение экспрессии микроРНК у потенциальных реципиентов сердца. / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, О.П. Шевченко, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № S. – С. 54-55.

11. Микро-РНК у реципиентов легких: перспективы клинического применения. / **Д.А. Великий**, С.О. Шарапченко, И.В. Пашков [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 2. – С. 138-144.

12. Особенности профиля экспрессии микроРНК у потенциальных реципиентов легких. / О.П. Шевченко, О.М. Цирульникова, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 3. – С. 33-38.

13. Изучение связи концентрации биомаркеров фиброза галектина-3 и костимуляции лимфоцитов sCD40L у пациентов до и после трансплантации легких с показателями экспрессии микроРНК. / О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № S. – С. 59-60.

14. Анализ корреляции экспрессии микроРНК с клиническими и лабораторными данными пациентов до и после трансплантации легких. / С.О. Шарапченко, О.М. Цирульникова, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № S. – С. 57-58.

15. Связь экспрессии микроРНК с показателями функции внешнего дыхания у пациентов с хронической дыхательной недостаточностью и реципиентов легких. / О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко, **Д.А. Великий** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № S. – С. 55-56.

16. **Великий Д.А.**, Гичкун О.Е., Марченко А.В., Улыбышева А.А., Шевченко А.О., Шевченко О.П. Уровень экспрессии микроРНК у реципиентов сердца и его связь с концентрацией биомаркеров отторжения и фиброза миокарда. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2020. Т. 22. № S. С. 38-39.

17. Уровень экспрессии микроРНК в ранние и отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов сердца. / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, С.О. Шарапченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 1. – С. 26-34.

18. Экспрессия микроРНК у реципиентов легких: корреляции с клиническими и лабораторными данными. / О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко, Д.А. Великий [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 2. – С. 86-96.

19. Связь уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов сердца с концентрацией биомаркеров посттрансплантационных осложнений. / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, А.А. Улыбышева [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 69-78.

20. Диагностическое значение микроРНК-101 и микроРНК-27 при остром отторжении трансплантированного сердца. / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, С.О. Шарапченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 20-26.

21. Диагностическая эффективность микроРНК-339 и галектина-3 при обструктивных изменениях дыхательных путей трансплантированных легких. / С.О. Шарапченко, О.М. Цирульникова, Д.А. Великий [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. – № 5. – С. 58.

22. Анализ диагностической значимости микроРНК miR-27 и miR-339 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца. / Д.А. Великий, О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. – № 5. – С. 48.

23. MiR-339 and galectin-3: diagnostic value in patients with airway obstruction after lung transplantation. / O.P. Shevchenko, O.M. Tsirulnikova, D.A. Velikiy [et al.]. // Transplant International. – 2021. – Vol. 34 (Suppl. 1). – P. 24.

24. The expression levels of circulating miR-101 and miR-27 associate with heart transplant acute rejection. / O.P. Shevchenko, A.O. Shevchenko, D.A. Velikiy, [et al.]. // Transplant International. – 2021. – Vol. 34 (Suppl. 1). – P. 31.

25. MiR-339 and galectin-3: diagnostic value in patients with airway obstruction after lung transplantation. / O. Shevchenko, O. Tsirulnikova, D. Velikiy [et al.]. // Transplant International. – 2021. – Vol. 34. – № 9. – P. 1733-1739.

26. МикроРНК-27 и -339 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца: анализ диагностической значимости. / О.П. Шевченко, Д.А. Великий, С.О. Шарапченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. – № 3. – С. 73-81.

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики обструкции бронхов у реципиентов легочного трансплантата. Шевченко О.П., Беков М.Т., Великий Д.А., Гичкун О.Е., Олешкевич Д.О., Пашков И.В., Цирульникова О.М., Шарапченко С.О., Готье С.В. Патент на изобретение RU 2750973 C1, 07.07.2021. Заявка № 2020139199 от 30.11.2020.

2. Способ диагностики обструкции бронха у реципиента трансплантированных легких. Шарапченко С.О., Беков М.Т., Великий Д.А., Гичкун О.Е., Олешкевич Д.О., Пашков И.В., Цирульникова О.М., Шевченко О.П., Готье С.В. Патент на изобретение RU 2759048 C1, 09.11.2021. Заявка № 2020139201 от 30.11.2020

3. Способ диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов трансплантированного сердца. Шевченко О.П., Великий Д.А., Гичкун О.Е., Можейко Н.П., Марченко А.В., Шарапченко С.О., Шевченко А.О. Патент на изобретение RU 2758994 C1, 08.11.2021. Заявка № 2020142677 от 23.12.2020.

4. Способ диагностики острого отторжения трансплантата у реципиента трансплантированного сердца. Великий Д.А., Гичкун О.Е., Можейко Н.П., Стаханова Е.А., Улыбышева А.А., Шевченко О.П., Шевченко А.О. Патент на изобретение RU 2758973 C1, 03.11.2021. Заявка № 2020142678 от 23.12.2020.

5. Способ неинвазивной диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца. Великий Д.А., Шарапченко С.О., Гичкун О.Е., Марченко А.В., Можейко Н.П., Улыбышева А.А., Шевченко А.О., Шевченко О.П. Патент на изобретение RU 2758993 C1, 08.11.2021. Заявка № 2021108611 от 30.03.2021.

6. Способ диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца. Шарапченко С.О., Великий Д.А., Гичкун О.Е., Можейко Н.П., Стаханова Е.А., Шевченко А.О., Шевченко О.П. Патент на изобретение RU 2759049 С1, 09.11.2021. Заявка № 2021108610 от 30.03.2021.

7. Способ диагностики обструкции бронха у реципиента легочного трансплантата. Великий Д.А., Беков М.Т., Гичкун О.Е., Олешкевич Д.О., Пашков И.В., Цирульников О.М., Шарапченко С. О., Шевченко О.П., Готье С.В. Решение о выдаче патента на изобретение от 24.09.2021. Заявка № 2020139200 от 30.11.2020

8. Способ неинвазивной диагностики фиброза миокарда у реципиентов сердечного трансплантата. Шарапченко С.О., Великий Д.А., Гичкун О.Е., Марченко А.В., Можейко Н.П., Шевченко А.О., Шевченко О.П., Готье С.В. Решение о выдаче патента на изобретение от 22.10.2021. Заявка № 2021109885 от 09.04.2021

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия
ДИ – доверительный интервал
ДКМП – дилатационная кардиомиопатия
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИФА – иммуноферментный анализ
КАГ – коронароангиография
ЛАГ – легочная артериальная гипертензия
микроРНК – микрорибонуклеиновая кислота
отн. ед. – относительные единицы
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
ТС – трансплантация сердца
ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России – федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких
ХСН – хроническая сердечная недостаточность
ЧТКА – чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика
ЭДТА – этилендиаминуксусная кислота
ЭМБ – эндомиокардиальная биопсия
ISHLT – (англ., International society for heart and lung transplantation) Международное общество трансплантации сердца и легких
MCP-1 – хемоаттрактантный белок макрофагов
miR – микрорибонуклеиновая кислота
PAPP-A – ассоциированный с беременностью плазменный белок А
PLGF – плацентарный фактор роста
RR – relative risk, относительный риск
sCD40L – растворимая форма лиганда CD40
ST2 – стимулирующий фактор роста
VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов-А