

УДК: 616.1.12-008.331.1-073-091.8+616.13

DOI: 10.37621/JNAMSU-2023-1-2-6

«Журнал НАМН України» | 2023 | т. 29 | № 1-2 | С. 73-85

ЕНДОТЕЛІАЛЬНА ДИСФУНКЦІЯ В ПАТОГЕНЕЗІ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ: НОВІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ

Т. В. Таласва

Державна установа «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска НАМН України», вул. Святослава Хороброго, 5, Київ 03151, Україна

Вступ. Артеріальна гіпертензія (АГ) залишається найрозповсюдженішим захворюванням системи кровообігу, а також одним із провідних факторів ризику розвитку серцево-судинних захворювань. Дослідження, що проведені протягом останнього часу свідчать, що ендотеліальна дисфункція може грати ключову роль в патогенезі АГ. Ендотеліальна дисфункція пов'язана з ушкодженням та прискореним апоптозом ендотеліоцитів (ЕЦ) і досить часто ці зміни виникають раніше, ніж проявляються морфологічні та клінічні ознаки захворювання. Дослідженнями останніх десятиліть було встановлено, що найважливіші властивості ендотелію - відновлення та збереження структурно-функціональної цілісності та його репаративна активність безпосередньо пов'язані з циркулюючими ендотеліальними прогеніторними клітинами – клітинами-попередниками ендотеліоцитів (КПЕ). Застосування різних маркерів для визначення КПЕ у циркулюючій крові, визначення вмісту злущених ЕЦ та резервної функції кісткового мозку (здатності продукувати КПЕ) дає можливість оцінити функцію ендотелію та ризик розвитку та прогресування серцево-судинних захворювань.

Мета: за допомогою метода проточної цитометрії оцінити можливість визначення вмісту у крові КПЕ, дезквамованих ЕЦ та резервної функції кісткового мозку (здатності продукувати КПЕ) як маркерів дисфункції ендотелію.

Матеріали та методи. В дослідження було включено 153 пацієнти з АГ. Всім пацієнтам були проведені реєстрація скарг, збір анамнезу, загальноклінічне обстеження, включно з вимірюванням офісного артеріального тиску (АТ) та добовим моніторуванням АТ, фізикальне обстеження, пробу з компресією плечової артерії для оцінки ендотелій-залежної вазодилатації. Кількість КПЕ периферичної крові визначали методом проточної цитометрії за допомогою реагентів для визначення кластерів диференціювання CD34, CD45, CD31, CD133 виробництва «Beckman Coulter Inc.» (США). В умовах проби з дозованим фізичним навантаженням на велоергометрі проводили визначення вмісту в крові КПЕ до та через 60 хв після завершення тесту на 55 пацієнтах з АГ.

Результати. В дослідженнях використовували комплексне визначення різних маркерів на поверхні КПЕ. У вихідному стані хворих з АГ кількість КПЕ (CD34⁺/CD45^{-/+}) була на 22 %, а у пацієнтів з резистентною гіпертензією на 28 % менше, ніж у практично здорових донорів ($p < 0,05$). Кількість КПЕ (CD133⁺CD31⁺CD45^{-/+}) у хворих з АГ було на 25 % менше, ніж в нормі. Кількість дезквамованих клітин перевищувало норму на 152 % ($p < 0,001$). У хворих з АГ відмічалось зниження резервної функції кісткового мозку (здатності продукувати КПЕ) у відповідь на ішемію, викликану стрес-навантаженням. Отримані дані підтверджуються результатами проби з компресією плечової артерії. Приріст діаметра плечової артерії у пацієнтів з контрольованою АГ становив $8,3 \pm 0,3$ %, що вказувало на порушення ЕЗВД (в

нормі значення показника перевищує 10 %). За результатами аналізу в групах з контрольованою та резистентною АГ було встановлено, що в останній індекс ЕЗВД був на 25 % меншим, ніж в групі пацієнтів з АГ, що добре контролюється ($p < 0,05$). Застосування стандартної терапії протягом 12 тижнів супроводжувалось зростанням кількості КПЕ у пацієнтів, що свідчило про відновлення функції ендотелію після проведеного лікування.

Висновки. У пацієнтів з АГ відмічалось зменшення вмісту в крові КПЕ. Резистентний перебіг гіпертензії асоціюється з більшими проявами ендотеліальної дисфункції. Визначення КПЕ за допомогою метода проточної цитометрії дає важливу додаткову інформацію про дисфункцію ендотелію як фактору ризику розвитку і прогресування АГ, а також може використовуватись для оцінки ефективності антигіпертензивної терапії.

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, ендотелій, дисфункція, клітини-попередники ендотеліоцитів.

Відомості про автора

Талаєва Тетяна Володимирівна – д. м. н., проф., завідувачка відділу клінічної фізіології та генетики ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска НАМН України», *ORCID: 0000-0002-9598-5281*

Для цитування: Талаєва ТВ. Ендотеліальна дисфункція в патогенезі артеріальної гіпертензії: нові методи діагностики. Журнал Національної академії медичних наук України. 2023;29(1-2);73-85. DOI: 10.37621/JNAMSU-2023-1-2-6.

Стаття надійшла до редакції 16.02.2023 року

Направлена на рецензування 27.02.2023 року

Прийнята до публікації 07.04.2023 року

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN THE PATHOGENESIS OF ARTERIAL HYPERTENSION: NEW DIAGNOSTIC METHODS

Tetiana V. Talaieva

State Institution «National Scientific Center «M. D. Strazhesko Institute of Cardiology, Clinical and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 5, Svyatoslava Khorobroho Str., Kyiv, Ukraine 03151

Introduction. Arterial hypertension (AH) remains the most widespread disease of the circulatory system, as well as one of the leading risk factors for the development of cardiovascular diseases. Recent studies indicate that endothelial dysfunction may play a key role in the pathogenesis of hypertension. Endothelial dysfunction is associated with damage and accelerated apoptosis of endothelial cells (ECs), and quite often these changes occur before morphological and clinical signs of the disease appear.

The researches of the last decades established that the most important properties of the endothelium - restoration and preservation of structural and functional integrity and its reparative activity are directly related to circulating endothelial progenitor cells - precursor cells of endotheliocytes (ECCs). The use of various markers for the determination of ECCs in circulating blood, the determination of the content of exfoliated endothelial cells and the reserve function of the bone marrow (ability to produce ECCs) makes it possible to assess the function of the endothelium and the risk of the development and progression of cardiovascular diseases.

Purpose: using the flow cytometry method to evaluate the possibility of determining the content of ECCs in the blood, desquamated ECs and the reserve function of the bone marrow (ability to produce ECCs) as markers of endothelial dysfunction.

Materials and methods. 153 patients with AH were included in the study. All patients underwent complaint registration, history taking, general clinical examination, including office blood pressure measurement and daily blood pressure monitoring, physical examination, brachial artery compression test to assess endothelium-dependent vasodilatation. The number of ECCs of peripheral blood was determined by the method of flow cytometry with the help of reagents for the determination of differentiation clusters CD34, CD45, CD31, CD133 manufactured by "Beckman Coulter Inc.". In the conditions of the test with dosed physical load, the blood content of ECCs was determined on a bicycle ergometer before and after 60 minutes. after completing the test on 55 patients with hypertension.

The results. In the studies, complex determination of various markers on the surface of the ECCs was used. At baseline, the number of ECCs (CD34⁺/CD45^{-/+}) was 22 % lower in patients with hypertension, and 28 % lower in patients with resistant hypertension than in practically healthy donors ($p < 0.05$). The number of ECCs (CD133⁺ CD31⁺ CD45^{-/+}) in patients with hypertension was 25 % less than in the norm. The number of desquamated cells exceeded the norm by 152 % ($p < 0.001$). In patients with hypertension, there was a decrease in the reserve function of the bone marrow to produce ECCs in response to ischemia caused by stress. The obtained data are confirmed by the results of the brachial artery compression test. Based on the results of the analysis in the groups with controlled and resistant hypertension, it was found that the last index of EDVD was 25 % lower than in the group of patients with hypertension that is well controlled ($p < 0.05$). The use of standard therapy for 12 weeks was accompanied by an increase in the number of ECCs in patients, which indicated the restoration of endothelial function after the treatment.

Conclusions. In patients with hypertension, a decrease in the content of ECCs in the blood was noted. The resistant course of hypertension is associated with greater manifestations of endothelial dysfunction. Determination of ECCs using the flow cytometry method provides important additional information about endothelial dysfunction as a risk factor for the development and progression of hypertension, and can also be used to assess the effectiveness of antihypertensive therapy.

Keywords: arterial hypertension, endothelium, dysfunction, endothelial progenitor cells.

Information about author

Tetiana V. Talaieva – Dr Sci. (Medicine), Prof., Head of the Department of Clinical Physiology and Genetics of the State Institution «National Scientific Center «M. D. Strazhesko Institute of Cardiology, Clinical and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», *ORCID: 0000-0002-9598-5281*

For citation: Talaieva TV. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of arterial hypertension: new diagnostic methods. *Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.* 2023;29(1-2);73-85. DOI: 10.37621/JNAMSU-2023-1-2-6.

The article was received 16.02.2023
For review, 27.02.2023
Accepted for publication 07.04.2023

Tetiana V. Talaieva
ORCID: 0000-0002-9598-5281
talaieva.t@gmail.com

ВСТУП

Артеріальна гіпертензія (АГ) залишається найрозповсюдженішим захворюванням системи кровообігу, а також одним із провідних факторів ризику розвитку серцево-судинних захворювань. На теперішній час близько 35 % дорослого населення України мають підвищений артеріальний тиск (АТ), що зумовлює те, що АГ та пов'язані з нею ускладнення продовжують залишатися однією з проблем сучасної медицини [1, 2].

Дослідження, що проведені протягом останнього часу свідчать, що ендотеліальна дисфункція може грати ключову роль в патогенезі АГ [3]. Збереження структурної та функціональної цілісності ендотелію має важливе значення для підтримки судинного гомеостазу. Ендотелій судин є ендокринним органом, що складається з метаболічно активних клітин, які продукують цілий ряд біологічно активних речовин. Вплив різноманітних факторів викликає комплекс змін в структурі та функції ендотелію. Термін «ендотеліальна дисфункція» (ЕД) розглядається як патологічний стан, що характеризується дисбалансом між продукцією вазодилатуючих, антимітогенних, протизапальних та антитромбогенних речовин та судинозвужуючих, протромботичних, прозапальних та проліферативних речовин [4]. Вперше ЕД була описана у 1990 році у пацієнтів з гіпертонічною хворобою. На сьогодні ЕД розглядається як один з найбільш важливих патогенетичних механізмів більшості захворювань серцево-судинної системи [5]. В розвитку даного патологічного стану важливу роль грає зменшення вивільнення NO судинною стінкою, підвищена його деградація, підвищена локальна секреція ендотеліну-1 та порушення його утилізації [6]. Провідною причиною розвитку ЕД при АГ вважають активацію системної чи локальної ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, що призводить до підвищеної продукції ангіотензину II – ефекторного ланцюга цієї системи. Ангіотензин II викликає вазоконстрикцію, активує локальне та системне запалення, стимулює продукцію прозапальних цитокінів та активних форм кисню, стимулює ріст та проліферацію гладком'язових клітин, сприяє лейкоцитарній адгезії, підвищенню адгезивного потенціалу ендотелію.

ЕД пов'язана з ушкодженням та прискореним апоптозом ендотеліоцитів (ЕЦ) і досить часто ці зміни виникають раніше, ніж проявляються морфологічні та клінічні ознаки захворювання. Традиційно вважали, що процеси відновлення ендотелію пов'язані з механізмом активації, проліферації та міграції власних клітин ендотелію. Проте дослідженнями останніх десятиріч було встановлено, що найважливіші властивості ендотелію – відновлення та збереження структурно-функціональної цілісності та його репаративна активність, безпосередньо пов'язані з циркулюючими ендотеліальними прогеніторними клітинами (КПЕ). Вперше циркулюючі прогеніторні клітини були описані Asahara et al. у 1997 році як циркулюючі КПЕ, що беруть участь в процесі васкулогенеза [7]. КПЕ володіють здатністю проліферувати та диференціюватися в ендотеліальні клітини, можуть заміщати дисфункціональні ЕЦ, а також служити джерелом паракринних сигналів для стимуляції місцевого ангіогенезу, оскільки секретують судинно-ендотеліальний фактор росту (Vascular endothelial growth factor, VEGF), інтерлейкін-8 (Interleukin-8, IL-8), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF) та ін. [8]. Кількість КПЕ у периферійній крові та їх функціональний стан відображають ендогенний резерв ендотелію і можуть слугувати біомаркерами судинної функції та прогностичними індексами судинних порушень. Кількість циркулюючих КПЕ складає 1-5 % від загальної популяції клітин кісткового мозку та менше ніж 0,0001-0,01% циркулюючих в крові периферійних мононуклеарних клітин [9]. У відповідь на ураження або ішемію периферійних тканин відбувається вихід КПЕ з кісткового мозку у кров та їх міграція у зону ураження. Процес залучення та міграції КПЕ в організмі здійснюється під дією сигналів від імунних клітин, що знаходяться безпосередньо у зоні ураження. Під дією ряду цитокінів та факторів росту відбувається мобілізація та вивільнення КПЕ з депо, їх

направлена міграція та вбудовування у ділянки судинного ураження (так званий «хоумінг») [10]. Після цього відбувається диференціація КПЕ у зрілі ендотеліальні клітини. Популяція КПЕ гетерогенна і включає декілька субпопуляцій гематопоетичних стовбурових клітин. Субпопуляція кістковомозкових КПЕ становлять «ранні» та «пізні» клітини-попередники. Загальноприйнято, що ідентифікаційною характеристикою КПЕ є експресія специфічних маркерів на поверхні клітин. «Ранні» КПЕ експресують на плазматичній мембрані маркери лейкоцитів (CD45, CD11 і CD14), ендотеліальні маркери (CD31, CD34 і VEGF-A) і гемопоетичний маркер CD133 [11]. «Пізні» КПЕ експресують маркери CD31, CD144, CD146, CD105, VEGFR2 (CD309) і рецептор домена кіназної вставки (Kinase insert domain receptor, KDR). Проте, на сьогодні точний фенотип КПЕ, що здатні диференціюватися саме в ендотеліальні клітини, не визначено. Одні дослідники для ідентифікації КПЕ використовують антигени CD133, CD34, VEGFR2 (CD309) або їх комбінації. Разом з тим, інші автори використовують для ідентифікації КПЕ маркер ендотеліальних клітин CD31 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1) та маркер стоволових клітин CD133. CD31 (PECAM-1) – мембранозв'язана форма молекул адгезії ендотелію та тромбоцитів першого типу і є глікопротеїном з розміром 130 кДа. Їх основна роль полягає у підтримці цілісності судинної стінки. Вважають, що для циркулюючих КПЕ характерний фенотип CD31⁺/CD133⁺, в той час як фенотип CD31⁺/CD133⁻ характеризує злучені ЕЦ, що циркулюють у крові [12].

Ідентифікація КПЕ є досить складним завданням у клініці. Найбільш часто для визначення цих клітин використовується одночасна експресія поверхневих маркерів. Asahara et al. вперше схарактеризували КПЕ як субпопуляцію CD34⁺ – гемопоетичних клітин-попередників. Було показано, що саме ці клітини здатні диференціюватися в ендотеліальні клітини *in vitro*. Найбільш часто для визначення КПЕ використовуються поверхневі маркери CD34, CD133 (промінін 1, Prominin 1) і рецептор судинно-ендотеліального фактора росту 2 – CD 309 (Vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2). Дані клітини також експресують і інші ендотеліальні маркери, такі як CD31 (пластинчаста ендотеліальна молекула адгезії-1, Platelet endothelial adhesion molecule-1, PECAM-1), тирозинкіназний рецептор-2 (Receptor tyrosin kinases, RTK-2), E-селектин (E-selectin), CD144 (кадагерин судинного ендотелію, Vascular endothelial cadherin) та ін. Проте, на думку ряду дослідників на сьогодні для ідентифікації КПЕ доцільно використовувати антигени CD31, CD34, CD133 і CD309 при низькій експресії CD45 [9].

На сьогодні вважають, що при дії на стінку судини уражуючих факторів, таких як прозапальні цитокіни, активні форми кисню, ангіотензин II та інші, відбувається ушкодження ЕЦ із можливою їх десквамацією у кровотік [13]. Такі ЕЦ є десквамованими (злученими). Відзначають, що у практично здорових добровольців відмічається низький рівень злучених ЕЦ у периферійній крові, оскільки існує баланс між ураженням та відновленням ендотелію. Збільшення кількості десквамованих ЕЦ у крові відмічається при прогресуванні ЕД та може слугувати прогностичним маркером судинних порушень та серцево-судинних захворювань. До сьогоднішнього часу серед дослідників ведуться дискусії про те, який рівень КПЕ (високий або низький) у периферійній крові є предиктором серцево-судинних ускладнень. Ось чому застосування різних антитіл до поверхневих маркерів клітин дозволяє більш точно трактувати отримані результати. Результати досліджень останніх років свідчать про те, що підвищення відсотка КПЕ у периферійній крові розглядається як компенсаторна реакція організму у відповідь на розвиток ЕД, а підвищення відсотка злучених ЕЦ – про ураження ендотелію. Крім того, досить важливим фактором зниження ризику розвитку ЕД є здатність кісткового мозку продукувати КПЕ у відповідь на ураження або ішемію, тому дослідники використовують проби з навантаженням для визначення резервної функції кісткового мозку – здатності продукувати КПЕ.

Таким чином, застосування різних маркерів для визначення КПЕ у циркулюючій крові, визначення вмісту злущених ЕЦ та резервної функції кісткового мозку (здатності продукувати КПЕ) дає можливість оцінити функцію ендотелію та ризик розвитку та прогресування серцево-судинних захворювань.

Метою дослідження було за допомогою метода проточної цитометрії оцінити можливість визначення вмісту у крові КПЕ, десквамованих ЕЦ та резервної функції кісткового мозку (здатності продукувати КПЕ) як маркерів ЕД.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Під час дослідження дотримувалися принципів біоетики: основних положень «Конвенції про захист прав і гідності людини щодо застосування біології та медицини: Конвенції про права людини та біомедицину», прийнятої Радою Європи 04.04.1997 р., належної клінічної практики (Good Clinical Practice, GCP) від 1996 р., Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини в якості об'єкта дослідження», прийнятої в червні 1964 р. та переглянутої з 1975 по 2008 рр., і наказу Міністерства охорони здоров'я України «Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і Типового положення про комісію з питань етики» №66 від 13.02.2006 р. зі змінами за 2006-2008 рр. Всі пацієнти підписали інформовану згоду на участь у дослідженні.

В дослідження було включено 153 пацієнтів з АГ, середній вік $56,4 \pm 0,8$ року (чоловіків 51 %).

Критеріями включення в дослідження були:

- контрольована (на момент включення офісний АТ $< 140 / 90$ мм рт. ст.) та резистентна АГ (на момент включення офісний АТ $\geq 140 / 90$ мм рт. ст. на тлі терапії мінімум 3-ма антигіпертензивними препаратами з діуретиком включно) АГ II стадії;
- здатність пацієнта до адекватної співпраці в процесі дослідження та письмова інформована згода пацієнта на участь в дослідженні.

В дослідження не включали пацієнтів за умов: вторинна АГ; міокардит, вади серця, тяжка серцева недостатність; цукровий діабет у фазі декомпенсації та/або з епізодами гіпоглікемії в анамнезі; печінкова і ниркова недостатність; інфекційні захворювання; вагітність та грудне вигодування; злоякісні новоутворення.

На етапі скринінгу та по завершенню спостереження всім пацієнтам були проведені реєстрація скарг, збір анамнезу, загальноклінічне обстеження, включно з вимірюванням офісного АТ та добовим моніторуванням АТ, фізикальне обстеження, пробу з компресією плечової артерії для оцінки ендотелій-залежної вазодилатації (ЕЗВД).

Як контроль використовували дані 21 практично здорових осіб зіставних за віком та статтю.

В умовах проби з дозованим фізичним навантаженням на велоергометрі проводили визначення вмісту в крові КПЕ до та через 60 хв після завершення тесту на 55 пацієнтах з АГ. Кількість КПЕ (фенотип $CD45^{+/+}/CD34^{+}$) периферичної крові визначали методом проточної цитометрії за допомогою реагентів для визначення кластерів диференціювання $CD34$ і $CD45$ виробництва «Beckman Coulter Inc.» (США). Також визначали десквамовані ендотеліальні клітини та КПЕ в периферичній крові 98 пацієнтів з АГ методом проточної цитометрії за допомогою інших кластерів диференціювання $CD31$, $CD133$ та $CD45$ виробництва «Beckman Coulter Inc.» (США). 100 мкл периферичної крові інкубували протягом 15-20 хв з сумішшю РС7–кон'югованих моноклональних антитіл до $CD45$ та PE – кон'югованих моноклональних антитіл до $CD34$, («Beckman Coulter Inc.», США) в захищеному від світла місці. Далі проводили лізис еритроцитів за допомогою 500 мкл лізуючого розчину OptiLyse протягом 10 хв з наступним додаванням 500 мкл фосфатно-сольового буфера. Для підрахунку кількості клітин в мкл до суспензії клітин додавали 100 мкл флуоросфер FlowCount. Обрахування результатів було виконане на апараті NAVIOS («Beckman Coulter Inc.», США). Отримані дані були представлені у відсотках кількості КПЕ до загальної кількості лейкоцитів, а також в абсолютних величинах – кількості клітин на

один мл крові. Для налаштування протоколів використовували негативний контроль (проба крові без додавання моноклональних антитіл) та ізотипічний контроль з IgG1 IgG2b («Beckman Coulter Inc.», США). Цитофлуорометричний аналіз був виконаний на апараті NAVIOS за допомогою програмного забезпечення Navios EX Software, Version 2.2 («Beckman Coulter Inc.», США); реєстрували не менше 6×10^4 клітин на зразок.

Визначення концентрації асиметричного диметиларгініну (Asymmetric dimethylarginine, ADMA) в плазмі крові проводили імуоферментним методом на системі для автоматичного виконання імуоферментного аналізу «ThunderBolt» (США) за допомогою імуоферментних наборів («Immundiagnostik AG», Німеччина).

Для оцінки ендотеліального механізму регуляції судинного тонусу використовували пробу з компресією плечової артерії, яку проводили за загальноприйнятою методикою з оцінкою ЕЗВД за відсотком приросту діаметру плечової артерії на 90 с після 5 хв компресії [14].

Всі пацієнти, включені в дослідження, отримували лікування відповідно до протоколу надання допомоги пацієнтам з АГ, затвердженого наказом МОЗ України № 384 від 24.05.2012 року, яке включало антигіпертензивну терапію, статини, антитромбоцитарні та цукрознижувальні препарати за наявності показань.

Отримані дані обробляли за допомогою методів варіаційної статистики з використанням програми SPSS 10.0. Для кількісних змінних висновки про наявність неоднорідності зроблені на основі порівняння за допомогою критерію Ст'юдента для нормально розподілених даних або критерію Манна-Уїтні, якщо дані хоча б в одній групі не підлягали нормальному розподілу. Кількісні показники наведені у вигляді середньої величини (M) з відповідною помилкою середнього (m).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В дослідженнях, що ми проводили, використовували комплексне визначення різних маркерів на поверхні КПЕ. У 55 пацієнтів з АГ визначали КПЕ за допомогою маркерів CD34⁺/CD45^{-/+}. У вихідному стані у досліджуваних хворих кількість КПЕ становила $2751,3 \pm 123,6$ клітини/мл, що було на 22 % менше, ніж у практично здорових донорів ($3506,5 \pm 98,3$ клітини/мл) ($p < 0,05$). У пацієнтів з резистентною гіпертензією даний показник був ще меншим і становив $2532,5 \pm 109,1$ клітини/мл, що було на 28 % менше контрольного значення ($p < 0,05$).

Етапи виділення КПЕ за маркерами CD34 і CD45 в периферичній крові досліджуваного пацієнта за даними проточної цитометрії представлені на *рис. 1* і *рис. 2*.

Процес міграції КПЕ в організмі керується молекулярними сигналами від імунних клітин, що знаходяться безпосередньо в зоні ураження. Під дією ряду цитокінів та факторів росту відбувається мобілізація та вивільнення КПЕ з депо, їх направлена міграція та вбудовування в ділянки судинного ураження (так званій «хоумінг»). Дослідники вважають, що хоумінг включає послідовність скоординованих етапів залучення КПЕ в уражені ділянки судинної стінки, в тому числі, хемотаксис, адгезію та трансендотеліальну міграцію, після чого відбувається диференціювання КПЕ у зрілі ендотеліальні клітини. Протеази, що вивільняються під дією цитокінів, такі як еластаза, катепсин G та матриксна металопротеїназа-9, від'єднують КПЕ від адгезивної взаємодії з клітинами строми [10, 15]. Оксид азоту, естрогени, ліпопротеїди високої щільності, VEGF і еритропоєтин також сприяють підвищенню плазматичного титру КПЕ та залученню КПЕ в зону ураження фосфатидилінозитол-3-фосфат (PIP3)/Akt сигнальним шляхом [12]. Зв'язування КПЕ з ураженою ділянкою відбувається за допомогою молекул клітинної адгезії, таких як P/E-селектин та ICAM-1. Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор, що продукується активованими макрофагами M2, полегшує вихід КПЕ у кровоносне русло [13]. В умовах запалення та гіпоксії в місці ураження гіпоксичний ендотелій та активовані тромбоцити секретують фактор, що продукується стромальними клітинами-1 (Stromal cell-derived factor-1, SDF-1), експресія якого стимулюється та регулюється гіпоксія-індуцибельним фактором-1 α (Hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α) [11].

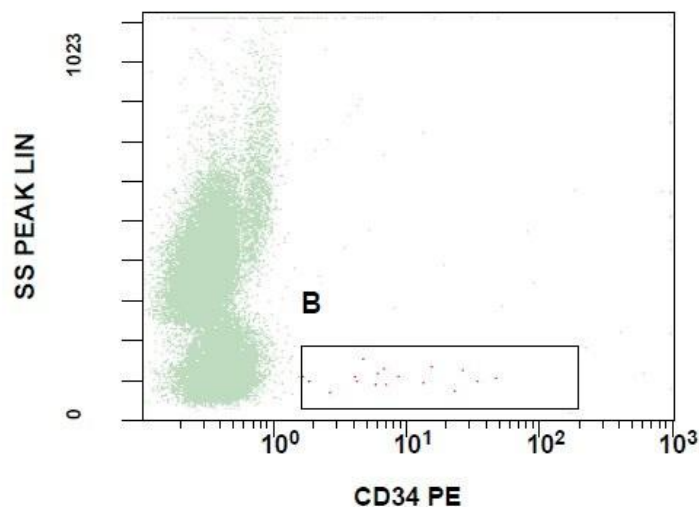


Рис. 1 / Fig. 1. Гістограма експресії маркера CD34 на клітинах периферичної крові / Histogram of CD34 marker expression on peripheral blood cells.

Примітка / Note: Гейт В – Клітини з поверхневою експресією CD34⁺ / Gate B – cells with surface expression of CD34⁺.

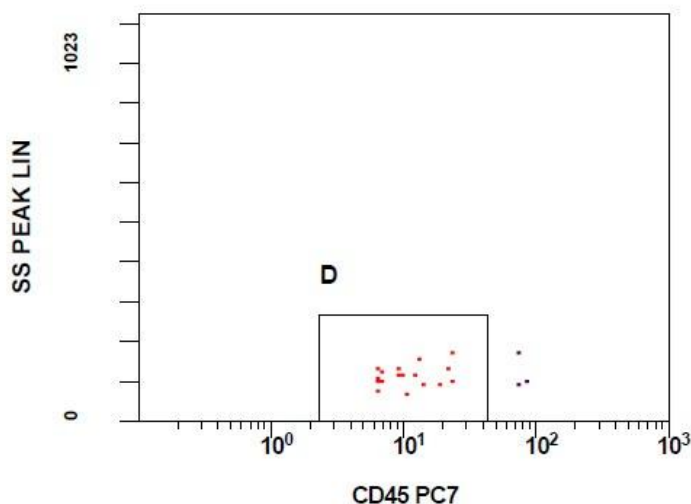


Рис. 2 / Fig. 2. Гістограма експресії маркера CD45 на клітинах з гейту В рис. 1 / Histogram of expression of the CD45 marker on cells from gate B in Fig. 1.

Примітка / Note: Гейт D – КПЕ (з поверхневою експресією CD34⁺ CD45^{+/+}) / Gate D – Endotheliocyte progenitor cells (with surface expression of CD34⁺ CD45^{+/+}).

Останнім часом ряд дослідників для визначення резервної функції кісткового мозку (здатності продукувати КПЕ) використовують тест з дозованим фізичним навантаженням як модель ішемії, що стимулює вивільнення КПЕ у кровотік [16].

Проведення тесту визначення резервної можливості кісткового мозку продукувати КПЕ у відповідь на ішемію, викликану стрес-навантаженням, у хворих з АГ продемонструвало збільшення на 10% КПЕ у порівнянні з вихідним значенням від $2751,3 \pm 123,6$ клітини/мл до $3026,7 \pm 123,6$ клітини/мл ($p > 0,05$), в той час як у пацієнтів з резистентною АГ відмічалось зменшення кількості КПЕ після стрес-навантаження на 14 % (від $2532,5 \pm 109,1$ клітини/мл

до $1922,6 \pm 116,4$ клітини/мл ($p < 0,05$). У практично здорових осіб кількість КПЕ після стрес-навантаження збільшується у 2 рази у порівнянні з їх вихідним значенням.

Застосування стандартної терапії протягом 12 тижнів супроводжувалось зростанням кількості КПЕ у пацієнтів з АГ на 15% (від $2751,3 \pm 123,6$ до $3163,9 \pm 115,3$ клітини/мл) ($p < 0,05$). Аналогічна тенденція змін відмічалась і в групі пацієнтів з резистентною АГ, проте вираженість змін була набагато меншою і не мала вірогідного характеру. Кількість КПЕ у даних пацієнтів після лікування зросла на 8% від $2532,5 \pm 109,1$ до $2735,1 \pm 122,3$ клітини/мл ($p > 0,05$), що свідчило про відновлення функції ендотелію після проведеного лікування. Відмічалось і відновлення резервної функції кісткового мозку щодо здатності продукувати КПЕ після проведеного лікування. Якщо до лікування після стрес-навантаження кількість КПЕ мала тенденцію до збільшення на 10% у пацієнтів з контрольованою АГ, то стандартна терапія супроводжувалась збільшенням КПЕ у відповідь на ішемію на 18%: від $2751,3 \pm 123,6$ до $3246,5 \pm 127,3$ клітини/мл ($p < 0,05$). У пацієнтів з резистентною АГ через 6 місяців після проведеного лікування не відмічалось вірогідних змін вмісту КПЕ після стрес-навантаження у порівнянні з даними, отриманими до призначення лікування.

Подібні дослідження визначення ЕД та резервної функції кісткового мозку (здатності продукувати КПЕ) були проведені іншими дослідниками [16, 17]. Було показано, що у хворих на ІХС зниження кількості КПЕ при стрес-індукованій ішемії пов'язано з гіршим прогнозом перебігу захворювання.

У 98 пацієнтів з АГ визначались КПЕ ($CD133^+/CD31^+/CD45^{-/+}$) та дезквамовані ЕЦ ($CD133^+/CD31^+/CD45^{-/+}$) за допомогою інших кластерів диференціювання: CD31, CD133 та CD45. Кількість КПЕ, визначених даним способом, у хворих з АГ було на 25% менше, ніж у нормі та становило $8723,1 \pm 112,3$ клітини/мл ($p < 0,05$). Кількість дезквамованих клітин перевищувало аналогічний показник у практично здорових осіб на 152% і становило $507,4 \pm 21,7$ клітини/мл ($p < 0,001$).

Етапи виділення КПЕ за маркерами CD45, CD31 і CD133 в периферичній крові досліджуваного пацієнта за даними проточної цитометрії представлені на *рис. 3* і *рис. 4*.

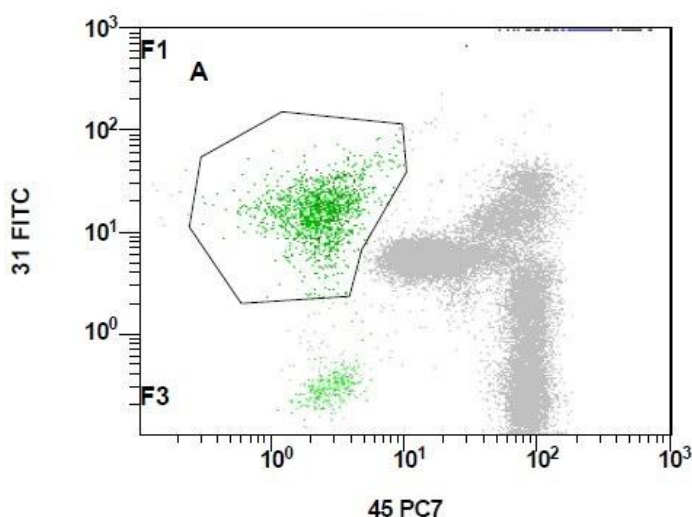


Рис. 3 / Fig. 3. Гістограма експресії маркерів CD45 і CD31 на клітинах периферичної крові / Histogram of CD45 and CD31 markers expression on peripheral blood cells.

Примітка / Note: Гейт А – КПЕ та дезквамовані ендотеліальні клітини (з поверхневою експресією $CD45^+/CD31^+$) / Gate A – Endotheliocyte progenitor cells and desquamated endothelial cells (with surface expression of $CD45^+/CD31^+$).

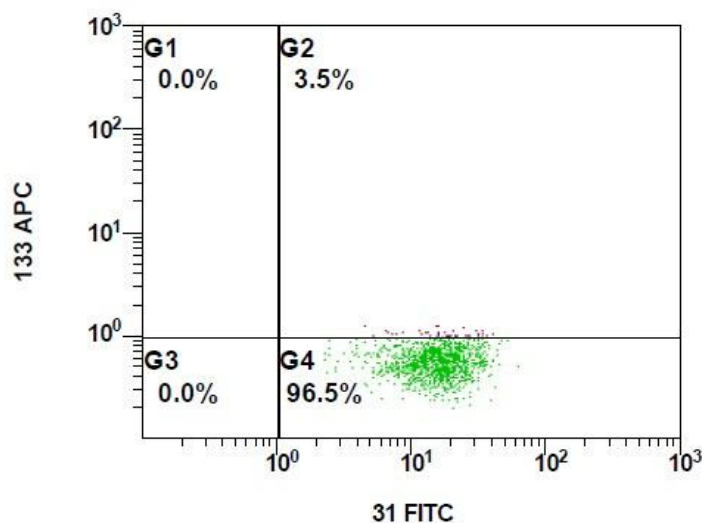


Рис. 4 / Fig. 4. Гістограма експресії маркерів CD31 та CD133 на клітинах з гейту А рис. 3 / Histogram of expression of CD31 and CD133 markers on cells from gate A of Fig. 3.

Примітка / Note: Квадрант G4 – десквамовані ЕЦ ($CD31^+/CD133^-$); квадрант G2 – КПЕ ($CD31^+/CD133^+$) / Quadrant G4 – desquamated endothelial cells ($CD31^+/CD133^-$); quadrant G2 – progenitor cells of endothelial cells ($CD31^+/CD133^+$).

Отримані дані щодо ЕД у хворих на АГ були підтвержені результатами клінічних досліджень. З метою вивчення функціонального стану ендотелію у пацієнтів з АГ проводили пробу з компресією плечової артерії. На початку періоду спостереження приріст діаметра плечової артерії у пацієнтів з контрольованою АГ становив $7,4 \pm 0,2$ %, що вказувало на порушення ЕЗВД (в нормі значення показника перевищує 10 %). За результатами аналізу в групах з контрольованою та резистентною АГ було встановлено, що в останній індекс ЕЗВД був на 25 % меншим, ніж в групі пацієнтів з АГ, що добре контролюється: $6,2 \pm 0,2$ % проти $8,3 \pm 0,3$ % ($p < 0,05$).

Через 12 тижнів лікування на тлі покращення контролю АТ показник приросту діаметру плечової артерії вірогідно зріс у всіх пацієнтів. Натомість спостерігали відмінності між групами: під впливом стандартного лікування в групі з контрольованою АГ він збільшився в 1,7 раза і досяг рівня $12,4 \pm 0,4$ % ($p = 0,01$), в групі пацієнтів з резистентною АГ його зростання було вірогідним до $9,8 \pm 0,3$ % ($p = 0,04$), але менш вираженим – в 1,3 раза.

Впродовж спостереження в обох групах пацієнтів спостерігали незначне, проте вірогідне зниження офісного й амбулаторного АТ внаслідок корекції антигіпертензивної терапії на візиті відбору. Зниження середньодобового САТ становило 10,9 % у групі з контрольованою АГ та 8,5 % у групі з резистентною АГ ($p = 0,67$), середньодобового ДАТ відповідно 10,3 % та 9,1 % ($p = 0,09$). Такі ж тенденції спостерігались і для ступеня зниження САТ і ДАТ в денний та нічний періоди доби. Однією з причин такого зниження АТ було відновлення функції ендотелію.

Попри досягнутий прогрес у лікуванні АГ, вона залишається основним фактором ризику розвитку інсульту, серцевої недостатності, ниркової недостатності, атеросклерозу та деменції. Одним з провідних патогенетичних факторів розвитку і прогресування АГ є ЕД [18, 19].

Дослідники використовують різні методи для оцінки вираженості ЕД. Так, в субаналізі дослідження ReHOT (Resistant Hypertension Optimal Treatment) у пацієнтів з резистентною АГ була встановлена більш виражена ЕД, що визначалось за вмістом в крові ADMA, що блокує синтазу оксиду азоту у порівнянні з пацієнтами з контрольованою АГ. При цьому

показник ADMA автори вважають незалежним предиктором РАГ, а зниження його рівня під впливом антигіпертензивної терапії асоціювалось зі зниженням АТ. Автори дослідження роблять висновки, що ADMA може слугувати не тільки маркером резистентності до терапії, а й бути показником ефективності проведеного лікування [20, 21].

Аналогічні дані були отримані в проведеному дослідженні. Так, концентрація ADMA в плазмі крові у пацієнтів з АГ становив $0,63 \pm 0,02$ мкмоль/л, що було на 31% більше, ніж в контролі ($p < 0,05$). Проведення стандартної антигіпертензивної терапії супроводжувалось зниженням концентрації ADMA в плазмі крові на 16 % (від $0,63 \pm 0,02$ до $0,53 \pm 0,01$ мкмоль/л ($p < 0,05$), що свідчило про відновлення функції ендотелію у пацієнтів з АГ.

Останнім часом широко використовується метод проточної цитометрії для визначення вираженості ЕД. Так за даними Maria E Marketou з співавт. у пацієнтів з гіпертонією не було виявлено вищих рівнів циркулюючих клітин $CD45^-/CD34^+/CD133^+$ порівняно з контрольною групою. Разом з тим, дані дослідження продемонстрували наявність кореляційного зв'язку між кількістю циркулюючих клітин $CD45^-/CD34^+/CD133^+$ і жорсткістю артерій, що свідчить про те, що ці клітини можуть відігравати роль у ремоделюванні судин.

В іншому дослідженні у хворих на АГ визначали вміст КПЕ ($CD34^+$), а також експресію в них мікроРНК (miR) 221 і 222 (miRs221/222) та рівень активних форм кисню та активність антиоксидантних ферментів. Було показано, що на початкових етапах розвитку АГ відмічалось підвищення вмісту КПЕ, в той час як навпаки, у пацієнтів з АГ та більш поширеними ураженнями окисно-відновний дисбаланс може призвести до посилення окислювального стресу та зменшення кількості клітин [22].

Проте, в подальших дослідженнях була показана хибність висновків щодо оцінки кількості КПЕ, яка базувалась на їх визначенні виключно за допомогою одного маркеру. Так, Magdalena Budzyń та співдослідники визначали вміст у крові циркулюючих ендотеліальних клітин ($CD45^-/CD34^+/CD146^+/CD133^-$), КПЕ ($CD45^-/CD34^+/CD146^+$) та їх співвідношення як маркери вираженості ЕД у пацієнтів з резистентною та контрольованою АГ. Було показано, що пошкодження ендотелію, яке проявляється збільшенням кількості десквамованих циркулюючих ЕЦ, і порушення його регенерації, що відображається у зниженому співвідношенні циркулюючих ЕЦ/КПЕ, передують виникненню гіпертрофії лівого шлуночка і можуть грати значну роль у її розвитку, незалежно від клінічної тяжкості перебігу гіпертензії. Крім того, автори роблять висновок про те, що КПЕ потенційно можуть служити скринінговим біомаркером у пацієнтів з гіпертензією для стратифікації ризику розвитку гіпертрофії лівого шлуночка [23].

Виходячи із суперечливих даних літератури, ми також застосовували в дослідженні різні кластери диференціювання для визначення КПЕ, злущених ЕЦ у циркулюючій крові та резервної функції кісткового мозку продукувати КПЕ у відповідь на ішемію, що дає можливість оцінити функцію ендотелію та ризик розвитку і прогресування серцево-судинних захворювань, перш за все, АГ.

ВИСНОВКИ

1. У пацієнтів з АГ відмічалось зменшення вмісту в крові КПЕ в порівнянні з їх кількістю у здорових донорів: КПЕ ($CD34^+/CD45^{-/+}$) – на 22 % менше, КПЕ ($CD133^+/CD31^+/CD45^{-/+}$) – на 25 %. За умов резистентної АГ спостерігався ще більший дефіцит КПЕ ($CD34^+/CD45^{-/+}$) – різниця з контрольним показником становила 28 %.
2. Резистентний перебіг гіпертензії асоціюється з більшими проявами ЕД, про що свідчить зниження на 25 % індексу ЕЗВД за результатами проби з компресією плечової артерії в порівнянні з показником у пацієнтів з контрольованою АГ.
3. Визначення КПЕ за допомогою метода проточної цитометрії дає важливу додаткову інформацію про ЕД як фактору ризику розвитку і прогресування АГ, а також може використовуватись для оцінки ефективності антигіпертензивної терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ/ REFERENCES

1. *Kovalenko VM, Lutai MI, Sirenko YuM, Sychov OS.* [Cardiovascular diseases. Classification, standards of diagnosis and treatment]. Kyiv: MORION; 2021.320 p. Ukrainian.
2. *Mishchenko LA, Sokolova LK, Kupchynska OG.* Stress and cardiovascular diseases in the conditions of martial law. Kyiv: Gordon; 2022. Chapter. Arterial hypertension, diabetes and chronic kidney disease: features of the course in conditions of stress and military status. 63-78. <https://cardiohub.org.ua/wp-content/uploads/2022/12/Stres-i-sertsevo-sudynni-zakhvoriuvannia-v-umovakh-voiennoho-stanu-szhat-y.pdf>
3. *de Zeeuw D, Parving HH, Henning RH.* Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(8):2100-5. doi:10.1681/ASN.2006050517.
4. *Puzyk SG.* Endothelial dysfunction in the pathogenesis of arterial hypertension and progression of atherosclerosis. *Family medicine.* 2018;(2):69-74.
5. *Versari D, Daghini E, Viridis A, et al.* Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 2009 Nov;32 Suppl 2(Suppl 2):314-21. doi: 10.2337/dc09-S330.
6. *Li Q, Youn JY, Cai H.* Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *J Hypertens.* 2015;33:1128-36. doi: 10.1097/HJH.0000000000000587.
7. *Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7. doi: 10.1126/science.275.5302.964.
8. *Giannotti G, Doerries C, Mocharla PS.* Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertensin: relation to endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2010;55:1389-97. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.141614.
9. *Karaahmet F, Kocaman SA.* Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells to overcome vascular deterioration and cytokine storm in critical patients with COVID-19. *Med Hypotheses.* 2020.144:109973. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109973.
10. *Zhu B, Zhang J, Chen J, Li C, Wang X.* Molecular biological characteristics of the recruitment of hematopoietic stem cells from bone marrow niche in chronic myeloid leukemia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(10):12595–607.
11. *Cotoia A, Cela O, Palumbo G, et al.* High mobilization of CD133+/CD34+ cells expressing HIF-1 α and SDF-1 α in septic abdominal surgical patients. *BMC Anesthesiol.* 2020;20(1):158. doi: 10.1186/s12871-020-01068-w.
12. *Zhang Q, Yin H, Liu P, et al.* Essential role of HDL on endothelial progenitor cell proliferation with PI3K/Atkt/cyclin D1as the signal pathway. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(9):1082-92. doi: 10.1258/ebm.2010.010060.
13. *Lolmede K, Campana L, Vezzoli M, et al.* Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J Leukoc Biol.* 2009.85(5):779-87. doi: 10.1189/jlb.0908579.
14. *Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al.* Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(2):257-65. doi: 10.1016/s0735-1097(01)01746-6.
15. *Marketou ME, Kalyva A, Parthenakis FI, et al.* Circulating endothelial progenitor cells in hypertensive patients with increased arterial stiffness. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2014;16(4):295-300. doi: 10.1111/jch.12287.
16. *Moazzami K, Lima BB, Hammadah M, et al.* Association between change in circulating progenitor cells during exercise stress and risk of adverse cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *JAMA Cardiol.* 2020;5(2):147-55. doi: 10.1001/jamacardio.2019.4528.

17. *Youn S-W, Lee S-W, Lee J, et al.* COMPAng1 stimulates HIF-1 α -mediated SDF-1 overexpression and recovers ischemic injury through BM-derived progenitor cell recruitment. *Blood*. 2011;117(16):4376–86. doi: 10.1182/blood-2010-07-295964.
18. *Harrison DG, Coffman TM, Wilcox CS.* Pathophysiology of hypertension. The mosaic theory and beyond. *Circulation Research*. 2021;128:847-63. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318082.
19. *Madhur MS, Eljovich F, Alexande M, et al.* Hypertension. Do inflammation and immunity hold the key to solving this epidemic? *Circulation Research*. 2021;128:908–33. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318052.
20. *Wilcox CS.* Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables. *Hypertension*. 2012;59:375-81. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187310.
21. *Beraldo D, Cássio J, Rodrigues CJ, Quinto BMR.* Role of endothelial function determined by asymmetric dimethylarginine in the prediction of resistant hypertension: A subanalysis of ReHOT trial. *J Clin Hypertens*. 2020;22(11):2059-68. doi: 10.1111/jch.13936.
22. *Mandraffino G, Imbalzano E, Sardo MA, et al.* Circulating progenitor cells in hypertensive patients with different degrees of cardiovascular involvement. *J Hum Hypertens*. 2014 Sept;28(9):543-50. doi: 10.1038/jhh.2014.7.
23. *Budzyń M, Gryszczyńska B, Boruckowski M, et al.* The potential role of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in the prediction of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Front Physiol*. 2019;10:1005. doi: 10.3389/fphys.2019.01005.