

Анализ информативности клинических, функциональных, лабораторных и генетических показателей оценки состояния пациентов, перенесших инфаркт миокарда, в прогнозе эффективности интрамиокардиальной аутологичной клеточной терапии хронической сердечной недостаточности

Коненков В. И.¹, Повещенко О. В.¹, Прокофьев В. Ф.¹, Шевченко А. В.¹, Ким И. Н.¹,
Бондаренко Н. А.¹, Караськов А. М.², Покушалов Е. А.², Романов А. Б.²

¹ФГБУ “НИИ клинической и экспериментальной лимфологии” СО РАМН. Новосибирск, Россия; ²ФГБУ “НИИ патологии кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина” МЗ РФ. Новосибирск, Россия

Цель. Выявить наличие или отсутствие связи между особенностями структуры индивидуальных комплексов клинических, функциональных, лабораторных и генетических показателей пациентов, перенесших инфаркт миокарда, с эффективностью интрамиокардиальной аутологичной клеточной терапии (ИАКТ).

Материал и методы. Исследование проведено у 71 пациента, мужчин (87%) и женщин, страдающих ишемической болезнью сердца с функциональным классом хронической сердечной недостаточности (ХСН) III-IV (NYHA) в возрасте 37-76 лет (в среднем — 57,0±0,9 лет). Процедуру введения мобилизованных мононуклеаров крови и оценку клинической эффективности ИАКТ проводили на базе ФГБУ “НИИПК имени академика Е. Н. Мешалкина” МЗ РФ (Новосибирск). Оценивались показатели ишемического анамнеза, объем фракции выброса левого желудочка, уровень продукции TNF-α и GM-CSF в культуре клеток крови пациентов, количество CD34+ клеток в крови до и после стимуляции G-CSF. Исследовался однонуклеотидный полиморфизм промоторного региона генов цитокинов (*TNF-308*, *TNF-238*, *TNF-863*, *IL1B-511*, *IL1B-31*, *IL4-590*, *IL6-174*, *IL10-592*, *IL10-1082*), фактора роста сосудистого эндотелия (*VEGF+936*, *VEGF-2578*) и матриксных металлопротеиназ (*MMP2-1306*, *MMP3-1171*, *MMP9-1562*).

Результаты. Из 11 клинических и лабораторных показателей, а также 14 полиморфных участков генов, лишь для двух генотипов

VEGF в полиморфной позиции +936 C/T выявлены достоверные ($p=0,0134$) различия для групп пациентов с наличием или отсутствием отдаленного клинического эффекта применения ИАКТ. Информативность комплексных количественных показателей и генотипических признаков существенно возрастает ($J=4,28-5,25$, $p<0,001$). При этом индивидуальные значения диагностических коэффициентов зачастую превышают, минимально необходимые для 95% вероятности прогноза, пороговые значения ($\pm 12,8$).

Заключение. Комплексные лабораторные и генетические показатели, сегрегированные в определенные комбинации, обладают высокой прогностической значимостью и могут быть использованы при разработке критериев оценки эффективности предстоящей клеточной терапии у больных с ХСН.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, аутологичные стволовые клетки, клеточная терапия, прогноз эффективности терапии.

Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2015; 14(1): 23–29
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2015-1-23-29>

Поступила 08/07-2014

Принята к публикации 09/09-2014

The analysis of clinical, functional, laboratory and genetic parameters values on the condition of patients after myocardial infarction, and prognosis of intramyocardial autologous cell therapy effectiveness for chronic heart failure

Konenkov V. I.¹, Poveshchenko O. V.¹, Prokofiev V. F.¹, Shevchenko A. V.¹, Kim I. N.¹, Bondarenko N. A.¹, Karaskov A. M.², Pokushalov E. V.², Romanov A. B.²

¹FSBI “SRI of clinical and experimental lymphology” SD RAMS. Novosibirsk, Russia; ²FSBI “SRI of circulatory pathology n.a. E. N. Meshalkin” of the Healthcare Ministry. Novosibirsk, Russia

Aim. To reveal or rule out an interconnection of the specifics of structure of clinical, functional, laboratory and genetic parameters of patients, who had myocardial infarction, with the effectiveness of intramyocardial autologous cell therapy (IACT).

Material and methods. The study involved 71 patients, 87% of men, with ischemic heart disease and III-IV functional class (NYHA) heart

failure at the age 37-76 y.o. (mean age 57,0±0,9 y.o.). The procedure of mobilized mononucleares loading into the blood and clinical effectiveness assessment was done at FSBI “SRICP n.a. E. N. Meshalkin” HM RF (Novosibirsk). The parameters of ischemic anamnesis were studied, left ventricle ejection volume, level of TNF-α and GM-CSF in cell cultures of patients' blood, the amount of CD34+ before and after G-CSF

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Тел./факс: + 7 (383) 311-05-40, (383) 311-05-89

e-mail: vf_prok@mail.ru

[Коненков В. И. — академик РАН, профессор, д.м.н., заведующий лабораторией клинической иммуногенетики, директор, Повещенко О. В. — к.м.н., заведующая лабораторией лимфотропной терапии и лимфодиагностики, Прокофьев В. Ф. — к.м.н., в.н.с. лаборатории клинической иммуногенетики, Шевченко А. В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории клинической иммуногенетики, Ким И. Н. — н.с. лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, Бондаренко Н. А. — аспирант лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, Караськов А. М. — академик РАН, профессор, д.м.н., директор, Покушалов Е. А. — д.м.н., профессор, заместитель директора, Романов А. Б. — к.м.н., хирург кардиохирургического отделения нарушений ритма сердца].

stimulation. The mononucleotide polymorphism of promotor region of cytokine genes studied (*TNF-308*, *TNF-238*, *TNF-863*, *IL1B-511*, *IL1B-31*, *IL4-590*, *IL6-174*, *IL10-592*, *IL10-1082*), of endothelial growth factor (*VEGF+936*, *VEGF-2578*) and of matrix metalloproteinases (*MMP2-1306*, *MMP3-1171*, *MMP9-1562*).

Results. Among 11 clinical and laboratory parameters, and 14 polymorphic gene areas, just for two genotypes of *VEGF* in polymorphic position +936 C/T there were significant ($p=0,0134$) differences revealed for patients groups with and without long-term clinical effect of IACT usage. Amount of information obtained from complex quantitative parameters and genotypic signs increases dramatically ($J=4,28-5,25$, $p<0,001$). Also individual values of diagnostic coefficients usually are

higher than minimally necessary of the 95% significance of prognosis, with threshold value ($\pm 12,8$).

Conclusion. Complex laboratory and genetic parameters, segregated into specific combinations have high prognostic value and can be used while developing the criteria of effectiveness evaluation of further cell therapy in CHF patients.

Key words: myocardial infarction, autologous stem cells, cell therapy, prognosis of therapy effectiveness.

Cardiovascular Therapy and Prevention, 2015; 14(1): 23–29

<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2015-1-23-29>

ИАКТ — интрамиокардиальная аутологичная клеточная терапия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, МНК — мононуклеары крови, ХСН — хроническая сердечная недостаточность, 95%CI — 95% Confidence Interval (95%-й доверительный интервал), DK — диагностические коэффициенты, G-CSF (Г-КСФ) — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, GM-CSF (ГМ-КСФ) — гранулоцитарно макрофагальный колониестимулирующий фактор, CD (CD34+) — кластер дифференцировки клеток, IL — гены интерлейкинов, OR — odds ratio (отношение шансов), TNF- α — фактор некроза опухолей альфа.

Введение

Эффективность терапии аутологичными стволовыми клетками, осуществляемой интракоронарной инфузией или интрамиокардиальным введением, была оценена в ряде пилотных исследований, показавших улучшение в 60% случаев через 12 мес. после процедуры [1-3]. Сходные по эффективности результаты были получены в исследованиях авторов настоящей работы, показавших отдаленную эффективность терапии в 70% случаев [4]. Во всех случаях не удается добиться 100% результатов, что справедливо связывают с различным исходным состоянием пациента, обширностью и локализацией перенесенного инфаркта миокарда (ИМ), их количеством, с функциональным состоянием миокарда и т.п.

Вместе с тем, проблема выбора терапии у конкретного пациента стоит очень остро, т.к. применение процедуры интрамиокардиальной аутологичной клеточной терапии (ИАКТ) занимает длительный период, требует специализированного высокотехнологического стационара, специалистов кардиохирургов и клеточных технологов, и, в какой-то степени, является альтернативой трансплантации сердца [5]. Исходя из этого, правильный подбор пациента для проведения ИАКТ является одной из актуальных задач персонализированной терапии, который способен значительно повысить ее эффективность у пациентов с прогнозируемым позитивным эффектом и исключения из листа ожидания пациентов с заведомо низким результатом или его отсутствием.

Учитывая актуальность проблемы, целью настоящего исследования служило выявления наличия или отсутствия связи между особенностями структуры индивидуальных комплексов клинических, функциональных, лабораторных и генетических показателей с эффективностью ИАКТ для последующей разработки персонифицированных критериев прогноза эффектов клеточной терапии у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

Материал и методы

Пациенты. Исследование проведено с участием 71 пациента, страдающего ишемической болезнью сердца (ИБС) с функциональным классом ХСН (NYHA) III-IV. Средний возраст пациентов $57,04 \pm 0,90$ ($M \pm m$) лет, 87% из них составляли мужчины. Длительность заболевания ИБС — $9,63 \pm 0,68$ лет, количество ИМ — $1,62 \pm 0,11$. Давность перенесенного ИМ ≥ 12 мес. Пациенты проходили обследование и плановое хирургическое лечение в Центре хирургической аритмологии ФГБУ «НИИ патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина МЗ РФ» (руководитель центра д.м.н. Покушалов Е. А.). Эффект терапии был изучен у 30 пациентов, из них у 21 больного клеточная терапия была эффективной, а у 9 — положительный эффект отсутствовал. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (GCP) и принципами Хельсинской Декларации. Протокол исследования одобрен Этическими комитетами и учеными советами обоих учреждений соисполнителей.

Объектом исследования служила периферическая кровь пациентов до введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ, G-CSF) и после мобилизации на 6 сут. В гематологической практике действие Г-КСФ как мобилизующего агента стволовых клеток в периферическую кровь хорошо изучено, при этом кластер дифференцировки клеток (CD34+) используется как маркер эффективности мобилизации [3, 4].

Мобилизация мононуклеаров периферической крови (МНК). Рекомбинантный человеческий Г-КСФ (Grasvalva, Израиль) вводился подкожно в дозе $3,3-5,0$ мкг/кг/сут. общим количеством 5 инъекций. До (0 сут.) и после мобилизации Г-КСФ (6 сут.) у пациентов забирались венозная кровь на параклинические исследования. На 6 сут. пациентам проводилась процедура аппаратного цитафереза на сепараторе клеток крови (Haemonetics MCS+, США). Использовалась программа PBSC (получение периферических стволовых клеток), параметры циркуляции и рециркуляции — recirculation №2, recirc ratio 1:3. Мононуклеарные клетки из сепарированной крови выделяли на градиенте плотности фиколла/верографи-на ($\rho=1,078$ г/л), дважды отмывали в забуференном физиологическом растворе, подсчитывали количество; жизнеспособность выделенных клеток оценивали окрашиванием витальным красителем (трипановый синий).

Определение фенотипа МНК периферической крови и мобилизованных МНК. Фенотип мононуклеаров перифериче-

ской крови исследовали на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, США) в программе FACSDiva (Becton Dickinson, США), в соответствии с инструкциями к прибору. Фенотип гемопозитических и эндотелиальных клеток предшественников исследовали с использованием моноклональных антител меченых FITC к CD34, (Becton Dickinson, США) согласно инструкции производителя.

Исследование уровней цитокинов в кондиционных средах МНК. Уровень продукции цитокинов фактора некроза опухолей (TNF- α) и гранулоцитарно макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF) изучали в кондиционных средах от 48 часовых культур МНК в спонтанном тесте. Концентрацию цитокинов определяли методом проточной флюориметрии на двулучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-PlexTM 200 System (BioRad, США) с использованием набора “Human Cytokine Th1/Th2 Assay” (BioRad, США).

Интрамиокардиальное введение мобилизованных МНК и оценка эффективности введения у пациентов с ХСН. Процедуру введения МНК, оценку клинической эффективности проводили на базе ФГУ “НИИ патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина МЗ РФ”. Пациентам интрамиокардиально под контролем навигационной системы NOGA XP в 10 точках вводили клетки по $1,5 \times 10^8$ /мл в объеме 2 мл. Эффективность интрамиокардиального введения мобилизованных Г-КСФ мононуклеаров периферической крови оценивали через 6 и 12 мес. по объему фракции выброса левого желудочка сердца с помощью эхокардиографии. Толерантность к физической нагрузке у пациентов оценивалась по тесту 6-минутной ходьбы, также определяли изменение функционального класса ХСН.

Генотипирование. Исследовался однонуклеотидный полиморфизм (SNP — single nucleotide polymorphism) промоторного региона генов цитокинов *TNFA* -863 C→A, *TNFA* -308 G→A, *TNFA* -238 G→A, *IL1 β* -511 T→C, *IL1 β* -31 C→T, *IL-4* -590 C→T, *IL-6* -174 G→C, *IL-10* -1082 G→A и *IL-10* -592 A→C; генов матричных металлопротеиназ *MMP2*-1306 C→T, *MMP3*-11715A→6A, *MMP 9* -1562 C→T; гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*+936 C→T, *VEGF* -2578 C→A. Генотипирование осуществляли методом рестриктного анализа продуктов амплификации (RFLP — restriction fragment length polymorphism). Участки промоторного региона генов амплифицировали с использованием пары специфичных праймеров, как описано ранее [6, 7], затем продукты амплификации подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции (“СибЭнзим”, Новосибирск). Электрофорез выполняли в 2,5% агарозном геле.

Статистика. При статистическом анализе результатов генетических исследований использовали такие показатели как частота распространения генов, генотипов и их комбинаций, как это принято в популяционной генетике [8].

Для описания количественных переменных использовались стандартные параметрические и непараметрические методы анализа, с учетом рекомендаций Гланц С. (1998) [9].

Расчет величины отношения шансов (OR, odds ratio) и 95%-го доверительного интервала (95% Confidence Interval — 95%CI) для него проводили по методу Вульфа-Холдейна, который допускает рассчитывать OR по таблице 2×2 для случаев, когда хотя бы одна из ячеек таблицы имеет значение ноль [10].

Для повышения степени выраженности взаимосвязи между количественными лабораторными показателями и разными эффектами терапии применяли критерия χ^2 Кол-

могорова — Смирнова. С помощью данного критерия определяли точку максимального расхождения между выборками, которая может использоваться как критическая при разделении всех испытуемых на тех, у кого “есть эффект”, и тех, у кого “нет эффекта” [11, 12].

Для оценки диагностической ценности клинико-лабораторных и генетических комплексов вычисляли значения специфичности (Sp), информативности (J) и диагностический коэффициент (DK) [12].

Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков при сравнении в группах обследованных определяли по двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц [9]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Статистическая обработка проводилась с помощью специализированных пакетов прикладных программ “Statistica 6.1” и “SPSS 13,0”.

Результаты и обсуждение

Предварительный анализ информативности целого ряда показателей состояния здоровья пациентов с ХСН, развившейся после перенесенного ИМ, выявил ряд потенциально значимых признаков, параметры которых связаны с последующей эффективностью ИАКТ. Перечень всех признаков оценки состояния пациентов, использованных в настоящем исследовании, и их коды для включения в последующие таблицы результатов исследования представлены в таблице 1.

Среди них оказались такие базовые клинико-анамнестические параметры, как пол и возраст пациента, длительность ишемического анамнеза, количество перенесенных ИМ и их отдаленность от времени проведения терапии. Из всех показателей оценки функционального состояния миокарда потенциально пригодным оказался лишь показатель фракции выброса левого желудочка. Среди большого числа использованных в настоящем ограниченном клиническом исследовании лабораторных показателей потенциально значимую прогностическую ценность показали всего четыре признака: уровень продукции TNF- α в супернатанте культур клеток крови пациентов; уровень продукции GM-CSF в культуре клеток крови пациентов; количество CD34+ клеток в крови до стимуляции G-CSF и количество CD34+ клеток в крови после стимуляции G-CSF.

Следует заметить, что когда выборки пациентов сопоставляются по каким-либо количественно измеренным показателям, возникает проблема выявления той точки распределения, которая может использоваться как критическая при разделении всех испытуемых на тех, у кого “есть эффект”, и тех, у кого “нет эффекта”. Для решения такого рода задачи зачастую используют квантильный анализ, с помощью которого удается получить оптимальные диапазоны, по которым сравниваемые выборки существенно различаются. Однако для исследуемых

Таблица 1

Перечень исследуемых предикторов эффективности ИАКТ

Клинические, функциональные и лабораторные показатели	Код	Значения		
Пол	SEX	M	F	
Возраст	AGE	L: ≤58	H: >58	
Длительность ишемического анамнеза (в годах)	LONG-IBC	L: ≤16	H: >16	
Количество перенесенных острых ИМ	NUMB-IM	L: ≤2	H: >2	
Давность ИМ (в годах)	LONG-IM	L: ≤4	H: >4	
Объем фракции выброса левого желудочка — до лечения (в %)	FVLJ-1	L: ≤43	H: >43	
Объем фракции выброса левого желудочка — после лечения (в %)	FVLJ-2	L: ≤53	H: >53	
Продукция TNF-α в культуре клеток крови пациентов (в пг/мл)	TNF-A	L: ≤292,05	H: >292,05	
Продукция GM-CSF в культуре клеток крови пациентов (в пг/мл)	GMCSF	L: ≤0,02	H: >0,02	
Количество CD34+ клеток в крови до стимуляции G-CSF (в %)	CD34+ 1	L: ≤0,01	H: >0,01	
Количество CD34+ клеток в крови после стимуляции G-CSF (в %)	CD34+ 2	L: ≤0,28	H: >0,28	
Генетические показатели	Код	Значения		
Генотип гена ФНОА	TNF-863	CC	CA	AA
	TNF-308	GG	GA	AA
	TNF-238	GG	GA	AA
Генотип гена интерлейкина-1В	IL1B-511	TT	TC	CC
	IL1B-31	TT	TC	CC
Генотип гена интерлейкина-4	IL4-590	CC	CT	TT
Генотип гена интерлейкина-6	IL6-174	GG	GC	CC
Генотип гена интерлейкина-10	IL10-1082	AA	AG	GG
	IL10-592	CC	CA	AA
Генотип гена фактора роста эндотелия сосудов	VEGF-2578	CC	CA	AA
	VEGF+936	CC	CT	TT
Генотип гена матричной металлопротеиназы 2	MMP2-1306	TT	TC	CC
Генотип гена матричной металлопротеиназы 3	MMP3-1171	5A5A	5A6A	6A6A
Генотип гена матричной металлопротеиназы 9	MMP9-1562	CC	CT	TT

Примечания: альтернативные диапазоны значений признаков — верхний (H) и нижний (L) с точками максимального расхождения значений количественных показателей между выборками больных ХСН с разными эффектами клеточной терапии, рассчитанные на основе критерия Колмогорова — Смирнова.

показателей такой метод оказался неэффективным в силу малой численности подгрупп сравнения. Поэтому использовали другой, не менее мощный статистический подход — расчет критерия χ^2 Колмогорова — Смирнова, позволивший обнаружить точки максимального расхождения между двумя выборками по всем количественным показателям. По данным точкам максимального расхождения для каждого из признаков были определены альтернативные диапазоны — верхний (H) и нижний (L). Для решения вопроса о возможности изолированного (без связи с другими признаками) использования данных показателей в качестве биоединиц, пригодных для прогнозирования, было изучено сравнительное распределение исследованных клинических и лабораторных показателей, а также пола и возраста в двух группах больных с различными эффектами клеточной терапии.

Проведенный анализ показал достаточно низкую информативность для использования этих отдельных показателей в качестве прогностических признаков — лишь в двух случаях удалось получить уровень достоверности различий по двустороннему

критерию точного метода Фишера между сопоставляемыми группами пациентов <0,05. Этими показателями оказались гомозиготные генотипы CC гена VEGF в позиции +936 C/T, который выявился у всех пациентов с позитивным эффектом ИАКТ, но и половины пациентов с негативным ответом (OR=17,35; p=0,0134). Ассоциированность с негативным ответом на ИАКТ установлена для пациентов с гетерозиготным генотипом CT того же гена в той же точке полиморфизма (OR=0,07; p=0,0289). Для всех остальных 23 признаков достоверных ассоциаций с эффективностью терапии установлено не было.

Известно высказывание о том, что математический анализ признаков значительно повышает полноту использования информации, а анализ комплекса показателей не только суммирует дифференцирующие способности признаков, но и выявляет новые дополнительные возможности распознавания, не содержащиеся ни в одном отдельном признаке [13].

Получив такие результаты, перешли к следующему этапу анализа, при котором в качестве прогностических признаков используются самые различные комбинации клинических, анамнестиче-

Таблица 2

Частота комбинации комплексов клинических, функциональных и лабораторных признаков в группах пациентов с ХСН с наличием и отсутствием клинической эффективности ИАКТ

Комбинации исследуемых признаков	Значения признаков	Нет эффекта, %	Есть эффект, %	OR	OR95%CI	Специфичность (Sp, %)
AGE:LONG-IM:FVLJ-1:CD34+ 2	L-H-L-H	80,00	0,00	81,00	2,78 — 2364,33	100,00
SEX:AGE:LONG-IM:FVLJ-1:CD34+ 2	M-L-H-L-H	80,00	0,00	81,00	2,78 — 2364,33	100,00
LONG-IM:FVLJ-2:CD34+ 2	H-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
SEX:LONG-IM:FVLJ-2:CD34+ 2	M-H-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
AGE:LONG-IM:FVLJ-2:CD34+ 2	L-H-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:CD34+ 2	H-L-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
SEX:AGE:LONG-IM:FVLJ-2:CD34+ 2	M-L-H-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
SEX:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:CD34+ 2	M-H-L-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
AGE:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:CD34+ 2	L-H-L-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
SEX:AGE:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:CD34+ 2	M-L-H-L-L-H	80,00	0,00	69,00	2,35 — 2028,86	100,00
AGE:LONG-IM:CD34+ 2	L-H-H	80,00	7,69	48,00	2,40 — 958,29	92,31
LONG-IM:FVLJ-1:CD34+ 2	H-L-H	80,00	7,69	48,00	2,40 — 958,29	92,31
SEX:AGE:LONG-IM:CD34+ 2	M-L-H-H	80,00	7,69	48,00	2,40 — 958,29	92,31
SEX:LONG-IM:FVLJ-1:CD34+ 2	M-H-L-H	80,00	7,69	48,00	2,40 — 958,29	92,31
SEX:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1	M-L-H-L	66,67	5,26	36,00	3,12 — 414,91	94,74
SEX:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-2	M-L-H-L	62,50	5,88	26,67	2,24 — 317,16	94,12
AGE:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-2	L-L-H-L	62,50	5,88	26,67	2,24 — 317,16	94,12
SEX:AGE:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-2	M-L-L-H-L	62,50	5,88	26,67	2,24 — 317,16	94,12
SEX:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2	M-L-H-L-L	62,50	5,88	26,67	2,24 — 317,16	94,12
AGE:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2	L-L-H-L-L	62,50	5,88	26,67	2,24 — 317,16	94,12
SEX:AGE:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2	M-L-L-H-L-L	62,50	5,88	26,67	2,24 — 317,16	94,12
AGE:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1	L-L-H-L	55,56	5,26	22,50	2,03 — 249,25	94,74
SEX:AGE:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1	M-L-L-H-L	55,56	5,26	22,50	2,03 — 249,25	94,74
NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1	L-H-L	66,67	10,53	17,00	2,26 — 127,75	89,47
AGE:LONG-IM:FVLJ-2	L-H-L	75,00	16,67	15,00	1,98 — 113,56	83,33
SEX:AGE:LONG-IM:FVLJ-2	M-L-H-L	75,00	16,67	15,00	1,98 — 113,56	83,33
AGE:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2	L-H-L-L	75,00	16,67	15,00	1,98 — 113,56	83,33
SEX:AGE:LONG-IM:FVLJ-1:FVLJ-2	M-L-H-L-L	75,00	16,67	15,00	1,98 — 113,56	83,33

Примечания: OR95%CI — 95%-й доверительный интервал для OR. Приведены значения частот (в %) комбинированных признаков в сравниваемых группах, для которых уровень статистической значимости различий по двустороннему критерию точного метода Фишера соответствовал $p < 0,01$; AGE — возраст; SEX — пол.

ских и лабораторных показателей. Таких показателей, уровень достоверности различий которых превышает $p < 0,05$, оказалось довольно много — 162, что позволило отобрать из них показатели с наибольшей информативностью (таблица 2).

К применению в прогностических целях можно рекомендовать 28 комбинированных клинико-лабораторных показателей, частота которых в сопоставляемых группах пациентов с ХСН, различается с уровнем достоверности $p < 0,01$. Особое внимание привлекают показатели верхней части ранжированной таблицы, частота которых в группе пациентов с отсутствием клинического эффекта от ИАКТ, равна нулю, тогда как среди пациентов с положительным эффектом эти показатели встречаются в 80% случаев. Следовательно, выявление такого симптомокомплекса у пациента с тяжелой ХСН, может служить основанием для назначения ИАКТ.

Имея результаты генотипирования таких пациентов, была оценена прогностическая значимость

генетических признаков. Она оказалась примерно сходной с предыдущими результатами. Здесь также выявили достаточное количество признаков — 146, достоверно различающихся по частоте распространения в альтернативных группах, 98 из которых ни в одном случае не встречались среди пациентов с отсутствием клинического эффекта ИАКТ. Однако невысокая частота их распространения среди пациентов с положительным эффектом (<40%) терапии не позволяет рекомендовать их раздельное использование в качестве прогностических критериев.

Только сочетанное применение всех имеющихся данных о пациенте позволило выработать высокоинформативные прогностические критерии эффективности ИАКТ (таблица 3). При заданном уровне достоверности различий $p < 0,05$, программа выделила значительный массив признаков-предикторов, альтернативно распространенных в сопоставляемых группах пациентов. Введение более жестких критериев уровня достоверности различий

Таблица 3

Частота комбинаций различных комплексов клинических, функциональных, лабораторных и генетических признаков в группах пациентов с ХСН с наличием и отсутствием клинической эффективности ИАКТ

Комбинации исследуемых признаков	Значения признаков	%		OR	OR95%CI	J	DK
		Нет эффекта,	Есть эффект,				
AGE:NUMB-IM:FVLJ-2:VEGF+936	L-L-L-CC	75,00	0,00	91,00	3,83 — 2160,16	5,25	14,3
AGE:NUMB-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:VEGF+936	L-L-L-L-CC	75,00	0,00	91,00	3,83 — 2160,16	5,25	14,3
AGE:NUMB-IM:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936	L-L-L-GG-CC	75,00	0,00	91,00	3,83 — 2160,16	5,25	14,3
NUMB-IM:FVLJ-1:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-GG-CC-CC	75,00	0,00	91,00	3,83 — 2160,16	5,25	14,3
AGE:NUMB-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936	L-L-L-L-GG-CC	75,00	0,00	91,00	3,83 — 2160,16	5,25	14,3
AGE:FVLJ-1:FVLJ-2:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-L-CC-CC	71,43	0,00	72,60	3,00 — 1756,45	4,86	13,8
FVLJ-1:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-GG-CC-CC	71,43	0,00	72,60	3,00 — 1756,45	4,86	13,8
AGE:FVLJ-1:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-L-GG-CC-CC	71,43	0,00	72,60	3,00 — 1756,45	4,86	13,8
AGE:NUMB-IM:FVLJ-1:VEGF+936	L-L-L-CC	66,67	0,00	72,43	3,28 — 1597,11	4,70	14,3
SEX:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1:VEGF+936	M-L-H-L-CC	66,67	0,00	72,43	3,28 — 1597,11	4,70	14,3
SEX:NUMB-IM:FVLJ-1:TNF-238:VEGF+936	M-L-L-GG-CC	66,67	0,00	72,43	3,28 — 1597,11	4,70	14,3
AGE:NUMB-IM:FVLJ-1:TNF-238:VEGF+936	L-L-L-GG-CC	66,67	0,00	72,43	3,28 — 1597,11	4,70	14,3
SEX:NUMB-IM:LONG-IM:FVLJ-1:TNF-238:VEGF+936	M-L-H-L-GG-CC	66,67	0,00	72,43	3,28 — 1597,11	4,70	14,3
AGE:NUMB-IM:FVLJ-2:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-L-CC-CC	71,43	0,00	68,20	2,81 — 1653,89	4,76	13,6
NUMB-IM:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-GG-CC-CC	71,43	0,00	68,20	2,81 — 1653,89	4,76	13,6
AGE:NUMB-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-L-L-CC-CC	71,43	0,00	68,20	2,81 — 1653,89	4,76	13,6
AGE:NUMB-IM:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-L-GG-CC-CC	71,43	0,00	68,20	2,81 — 1653,89	4,76	13,6
NUMB-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-L-GG-CC-CC	71,43	0,00	68,20	2,81 — 1653,89	4,76	13,6
AGE:NUMB-IM:FVLJ-1:FVLJ-2:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-L-L-GG-CC-CC	71,43	0,00	68,20	2,81 — 1653,89	4,76	13,6
AGE:FVLJ-1:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
NUMB-IM:LONG-IM:VEGF+936:MMP2-1306	L-H-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
NUMB-IM:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	L-CC-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
SEX:NUMB-IM:LONG-IM:VEGF+936:MMP2-1306	M-L-H-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
AGE:FVLJ-1:FVLJ-2:VEGF-2578:VEGF+936	L-L-L-CA-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
AGE:FVLJ-1:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-L-GG-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
LONG-IBC:NUMB-IM:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	L-L-CC-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
NUMB-IM:LONG-IM:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	L-H-GG-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
NUMB-IM:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	L-GG-CC-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
SEX:NUMB-IM:LONG-IM:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	M-L-H-GG-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
AGE:FVLJ-1:FVLJ-2:TNF-238:VEGF-2578:VEGF+936	L-L-L-GG-CA-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8
LONG-IBC:NUMB-IM:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	L-L-GG-CC-CC-CC	62,50	0,00	58,14	2,59 — 1306,73	4,28	13,8

Примечания: OR95%CI — 95%-й доверительный интервал для OR, J — информативность по Кульбаку. Приведены значения частот (в %) комбинированных генотипов в сравниваемых группах, для которых уровень статистической значимости различий по двустороннему критерию точного метода Фишера соответствовал $p < 0,001$; AGE — возраст; SEX — пол.

($p < 0,001$), позволило включить в итоговую прогностическую матрицу 31 комплексный показатель, где частота каждого из них в группе пациентов с ХСН и отсутствием эффекта применения ИАКТ, равна нулю. Тогда как среди пациентов с положительным эффектом ИАКТ отмечается высокая частота данных комплексов. Показатель информативности этих признаков, рассчитанный по методу Кульбака, колеблется в интервале от 4,28 до 5,25. Специфичность всех, включенных в таблицу 3 признаков, составляет 100%, а величина диагностического коэффициента колеблется в интервале от 13,8

до 14,3. Такие значения DK свидетельствуют о том, что вероятность правильного прогноза о предполагаемой высокой эффективности процедуры ИАКТ у пациента с соответствующей комбинацией признаков составляет $>95\%$ [12].

Частичная, хотя и преобладающая, эффективность применения ИАКТ в лечении в течение, как минимум 12 мес., после процедуры ее проведения доказана в работах целого ряда кардиохирургических центров [14, 15] и подтверждена в представленном клиническом исследовании. Такая избирательная эффективность требует попытки выработать критерии

отбора пациентов для применения ИАКТ. Как правило, такими клиническими критериями являются нарастающая тяжесть ХСН и угроза жизни пациента, его толерантность к лекарственной терапии и отсутствие реальной возможности трансплантации сердца. Предлагаемые дополнительные критерии включения отдельных пациентов с их индивидуальным генотипом и формализованными данными анамнеза, функционального состояния миокарда, показателями состояния пула собственных стволовых прогениторных клеток, могут способствовать более персонализированному применению ИАКТ, повышению ее эффективности и более широкому применению в кардиологической практике.

Заключение

Проведенное исследование показало, что из 11 последовательно проанализированных клинико-лабораторных показателей состояния пациента и 14 полиморфных участков генов цитокинов, факторов роста и металлопротеиназ, лишь для двух генотипов *VEGF* в полиморфной позиции +936 C/T выявлены достоверные различия для групп пациен-

тов с наличием или отсутствием отдаленного клинического эффекта применения ИАКТ. Эти результаты свидетельствуют о низкой информативности и прогностической значимости их изолированного использования в клинической практике.

С другой стороны, представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что лишь совместное использование в анализе клинических, функциональных, лабораторных и генетических признаков позволило включить в итоговую диагностическую таблицу >30 статистически достоверных ($p < 0,001$) комплексных показателей с высокой прогностической значимостью. При этом информативность комплексных количественных показателей и генотипических признаков (генных ансамблей) существенно возрастает, а по ряду позиций достигает 100% специфичности, при этом индивидуальные значения ДК зачастую превышают пороговые значения ($\pm 12,8$). Эти результаты указывают на возможность использования данных комбинированных показателей в качестве прогностических критериев оценки эффективности предстоящей интрамиокардиальной аутологичной клеточной терапии у пациентов с ХСН.

Литература

1. Bokerija LA, Buziashvili Jul, Mackeplishvili ST, Kamardinov DH. First experience of bone marrow stem cells for regenerative therapy of coronary heart disease. *Kardiologija* 2004; 44(9): 16-22. Russian (Бокерия Л.А., Бузиашвили Ю.И., Мацкеплишвили С.Т., Камардинов Д.Х. Первый опыт применения стволовых клеток костного мозга для регенерационной терапии ишемической болезни сердца. *Кардиология*. 2004; 44(9): 16-22).
2. Chang SA, Kang HJ, Lee H.Y, et al. Peripheral blood stem cell mobilisation by granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute and old myocardial infarction for intracoronary cell infusion. *Heart* 2009; 95(16): 1326-30.
3. Kang HJ, Kim HS, Koo BK, et al. Intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cell by G-CSF is better than mobilization alone by G-CSF for improvement of cardiac function and remodeling: 2-year follow-up results of the Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction with G-CSF and Intra-Coronary Stem Cell Infusion (MAGIC Cell) 1 trial. *Am Heart J* 2007; 153(2): 237.e1-8.
4. Kim II, Poveshchenko OV, Bondarenko NA, et al. The influence of morphological and functional properties of mobilized progenitor cells in patients with chronic heart failure on the effectiveness of autologous intramyocardial cell transplantation. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2014; 2: 117-23. Russian (Ким И.И., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А. и др. Влияние морфофункциональных свойств мобилизованных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью на эффективность аутологичной интрамиокардиальной клеточной трансплантации. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2014; 2: 117-23).
5. Kononkov VI, Poveshchenko OV, Karas'kov AM, Pokushalov EA. Cellular technology treatment of severe chronic heart failure, as an alternative to heart transplantation. I National Congress on Regenerative Medicine 4-6 December 2013. Moscow 2013; 124. Russian (Коненков В.И., Повещенко О.В., Караськов А.М., Покушалов Е.А. Клеточные технологии лечения тяжелой хронической сердечной недостаточности, как альтернатива трансплантации сердца. I Национальный конгресс по регенеративной медицине 4-6 декабря 2013 г. Москва 2013; 124).
6. Kononkov VI, Shevchenko AV, Prokofiev VF, et al. Cytokine gene networks in a personalized prediction of human health and the formation of groups at high risk for disease prevention. *Preventive Medicine* 2013; 4: 19-26. Russian (Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф. и др. Цитокиновые генные сети в персонализированном прогнозе состояния здоровья человека и формирования групп высокого риска развития заболеваний для проведения профилактических мероприятий. *Профилактическая медицина* 2013; 4: 19-26).
7. Kononkov VI, Shevchenko AV, Prokofiev VF, Maksimov VN. Complex cytokine genotypes as a genetic risk factor for myocardial infarction in men Caucasoid population in Russia. *Kardiologija* 2012; 7: 22-9. Russian (Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Максимов В.Н. Комплекс генотипов цитокинов как генетический фактор риска развития инфаркта миокарда у мужчин европеоидного населения России. *Кардиология* 2012; 7: 22-9).
8. Weir B. Genetic Data Analysis: Discrete genetic traits. Translation from English. M.: Mir; 1995. Russian (Бейр Б. Анализ генетических данных: Дискретные генетические признаки. Пер. с англ. М.: Мир; 1995).
9. Glantz S. Biomedical Statistics. Translation from English. M.: Praktika; 1998. Russian (Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика; 1998).
10. Babich PN, Chubenko AV, Lapach SN. Application of modern statistical methods in the practice of clinical research. Third message. Odds ratio: concepts, calculation and interpretation. *Ukrainian Medical J* 2005; 2(46): 113-9. Russian (Бабич П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятия, вычисление и интерпретация. *Украинский медицинский ж* 2005; 2(46): 113-9).
11. Lashkov KV, Poljakov LE. Application of the methods of nonparametric statistics in scientific medical research. In: Statistical methods of research in medicine and health. M.: Medicina 1971; 32-92. Russian (Лашков К.В., Поляков Л.Е. Применение методов непараметрической статистики в научных медицинских исследованиях. В кн.: Статистические методы исследования в медицине и здравоохранении. М.: Медицина 1971; 32-92).
12. Gubler EV. Computational methods of analysis and recognition of pathological processes. L.: Medicina; 1983. Russian (Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина; 1983).
13. Genes VS. Some simple methods of cyber data diagnostic and physiological studies. M.: Nauka; 1967. Russian (Генес В.С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований. М.: Наука; 1967).
14. Davydenko VV, Gricenko VV, Afanas'ev BV, et al. Intracardiac and other mononuclear cells transplantation of autologous bone marrow in treatment of patients with valvular heart. *Vestnik Khirurgii Imeni I.I. Grekova* 2007; 166(3): 16-21. Russian (Давыденко В.В., Гриценко В.В., Афанасьев Б.В. и др. Интракардиальная трансплантация мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга в комплексном лечении больных с пороками клапанов сердца. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова* 2007; 166(3): 16-21).
15. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110(Suppl. II): 213-8.