

Abstract

B. O. Koshak,

*Ternopil State Medical University
n. a. I. Gorbachevsky, Department
of Internal Medicine №2*

**SERUM LEVELS OF CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS
AS A MARKER OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN
PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS**

Background. Ankylosing spondylitis (AS) is a disease affecting musculoskeletal system. Mortality rate among patients with AS is 1.5 times higher than in general population. The causes of death include cardiovascular disease and chronic renal failure.

Now it is clear that the presence of chronic systemic inflammation is an important predictor of cardiovascular (CV) disease due to development of endothelial dysfunction and subsequent atherosclerosis, atherothrombosis, remodelling of the vascular wall and myocardium and, therefore, it represent the main cause of numerous life-threatening adverse conditions.

Tasks of the research: To asses endothelial function by establishing the relationship between the level of circulating endothelial cells in the blood and the degree of endothelial dysfunction in patients with AS.

Materials and methods: A total of 110 patients with ankylosing spondylitis (AS) were examined with the use of standard diagnostic methods: disease activity, lipid profile, ultrasound assessment the carotid intima media thickness, evaluation endothelium-dependent vasodilatation in response to reactive hyperemia. Clinical activity of the disease was determined using the disease activity index BASDAI, BASFI functional index, index BASMI metrology, quality of life ASQoL. The determination of the level of circulating endothelial cells (CEC) in peripheral blood, which is considered a marker of damage and dysfunction of the endothelium, was performed out according to J. Hladovec.

Results: Elevated levels of CEC were detected in 84 % of cases. It was established that most often the increase of the level of CEC is observed in patients with II and III degree of activity. There were clear relationships between the parameters of the course of AS and the studied parameter: ESR ($r_s = 0.378$, $p < 0.05$), CRP ($r_s = 0.451$, $p < 0.05$), BASDAI ($r_s = 0.369$, $p < 0.05$) and demonstrated the dependence of the level of CEC in peripheral blood on the use of adequate anti-inflammatory therapy.

Conclusions. We assume that a significant relationship between levels of circulating endothelial cells and the degree of endothelial dysfunction in patients with AS exists, suggesting that the level of CEC is a marker of endothelial dysfunction in patients with AS.

Keywords: ankylosing spondylitis, endothelial dysfunction, circulating endothelial cells.

Corresponding author: *koshak_bohdan@yahoo.com*

Резюме**Б.О. Кошак,***кафедра внутрішньої медицини
№2, ДВНЗ «Тернопільський державний
медичний університет
ім. І. Я. Горбачевського МОЗ
України»***ВМІСТ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН В КРОВІ ЯК МАРКЕР ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У ХВОРИХ НА АНКІЛОЗИВНИЙ СПОНДИЛОАРТРИТ**

Актуальність: Відомо, що смертність серед пацієнтів з анкілозивним спондилоартритом (АС) в більшості випадків зумовлена серцево-судинною патологією, яка в свою чергу опосередкована наявністю хронічного системного запалення, який вважають вагомим предиктором розвитку серцево-судинних (СС) захворювань внаслідок розвитку дисфункції ендотелію.

Мета: Оцінити вагомість визначення маркера дисфункції ендотелію шляхом встановлення взаємозв'язків між рівнем циркулюючих ендотеліальних клітин в крові і ступенем ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з АС.

Матеріали і методи: обстежено 110 пацієнтів з АС, яким проводили стандартні діагностичні методи, що характеризують перебіг захворювання, а також параметри ліпідограми, оцінку ендотеліальної вазодилатації у відповідь на реактивну гіперемію. Визначення рівня циркулюючих ендотеліальних клітин (ЦЕК) в периферичній крові, що вважаються маркером ушкодження і дисфункції ендотелію, здійснювалося за методикою J. Hladovec. Клінічну активність недуги визначали за допомогою індексу активності захворювання BASDAI, функціонального індексу BASFI, метрологічного індексу BASMI, якості життя ASQoL.

Результати: згідно проведених досліджень, підвищений рівень ЦЕК виявлено в 84 % випадків. Встановлено, що найчастіше підвищення рівня ЦЕК спостерігається у пацієнтів з II та III ступенем активності. Були виявлені чіткі взаємозв'язки між параметрами перебігу АС і показником що вивчався: ШОЕ ($rs = 0,378$, $p < 0,05$), СРБ ($rs = 0,451$, $p < 0,05$), BASDAI ($rs = 0,369$, $p < 0,05$) та продемонстрована залежність вмісту ЦЕК у периферичній крові від факту застосування адекватної протизапальної терапії.

Висновок: таким чином, встановлені чіткі взаємозв'язки між рівнем циркулюючих ендотеліальних клітин в крові і ступенем ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з АС, що дозволяє вважати рівень ЦЕК маркером дисфункції ендотелію у пацієнтів з даною недугою.

Ключові слова: анкілозивний спондилоартрит, ендотеліальна дисфункція, циркулюючі ендотеліальні клітини.

Резюме**Б. А. Кошак,***кафедра внутрішньої медицини
№2, ТГМУ ім. І. Я. Горбачевського***СОДЕРЖАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ КАК МАРКЕР ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ НА АНКИЛОЗИРУЮЩИЙ СПОНДИЛОАРТРИТ**

Актуальность: известно, что смертность среди пациентов с анкилозирующим спондилоартритом в большинстве случаев обусловлена сердечно-сосудистой патологией, в свою очередь опосредованной наличием хронического системного воспаления, которое считается весомым предиктором развития сердечно-сосудистых (СС) заболеваний вследствие развития дисфункции эндотелия.

Цель: оценить значимость определения маркера дисфункции эндотелия путем установления взаимосвязей между уровнем цир-



кулирующих эндотелиальных клеток в крови и степенью эндотелиальной дисфункции у пациентов с АС.

Материалы и методы: обследовано 110 пациентов с АС, которым проводили стандартные диагностические методы, характеризующие течение заболевания, а также параметры липидограммы, оценку эндотелийзависимой вазодилатации в ответ на реактивную гиперемии. Определение уровня циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в периферической крови, которые считаются маркером повреждения и дисфункции эндотелия, осуществлялось по методике J. Hadovc. Клиническую активность болезни определяли с помощью индекса активности заболевания BASDAI, функционального индекса BASFI, метрологического индекса BASMI, качества жизни ASQoL.

Результаты: Согласно проведенным исследованиям, повышенный уровень ЦЭК обнаружено в 84 % случаев. Установлено, что чаще всего повышение уровня ЦЭК наблюдается у пациентов с II и III степени активности. Были обнаружены четкие взаимосвязи между параметрами течения АС и показателем, которые изучались: СОЭ ($r_s = 0,378$, $p < 0,05$), СРБ ($r_s = 0,451$, $p < 0,05$), BASDAI ($r_s = 0,369$, $p < 0,05$) и продемонстрирована зависимость содержания ЦЭК в периферической крови от факта применения адекватной противовоспалительной терапии.

Вывод: Таким образом, установлены четкие взаимосвязи между уровнем циркулирующих эндотелиальных клеток в крови и степенью эндотелиальной дисфункции у пациентов с АС, что позволяет считать уровень ЦЭК маркером эндотелиальной дисфункции у пациентов с этой болезнью.

Ключевые слова: анкилозирующий спондилоартрит, эндотелиальная дисфункция, циркулирующие эндотелиальные клетки.

Автор, відповідальний за листування: *koshak_bohdan@yahoo.com*

Вступ

Анкилозивний спондилоартрит (АС) – хронічне системне запальне захворювання з переважним ураженням осевого скелета (крижово-клубових, міжхребцевих, реберно-хребтових зчленувань), що належить до групи серонегативних спондилоартритів (СнА) [1; 4; 12].

Рівень смертності серед пацієнтів з АС в 1,5 рази вище популяційного [8] і зумовлений серцево-судинною патологією та хронічно нирковою недостатністю внаслідок амілоїдозу [3]. На сьогодні достовірно відомо, що наявність хронічного системного запалення є вагомим предиктором розвитку серцево-судинних (СС) захворювань [5; 7; 11; 12] внаслідок розвитку дисфункції ендотелію (ЕД), а в подальшому – атеросклерозу, атеротромбозу, ремоделювання судинної стінки і міокарда [10] і, відповідно, основною причиною значно вищих від загально популяційних випадків несприятливих загрозливих для життя станів.

Особливості розвитку дисфункції ендотелію на сьогодні досить добре і детально вивчені у

пацієнтів з ревматоїдним артритом, системним червоним вовчаком. У той же час, незважаючи на широку поширеність АС серед чоловіків, дана проблема мало обговорюється і досліджується в когорті вказаних пацієнтів. Практично відсутні відомості про вплив активності системного запалення на функціональний стан ендотелію при АС, немає інформації про можливість корекції дисфункції ендотелію на тлі протизапальної терапії.

Сучасні методи оцінки стану ендотелію або надзвичайно трудомісткі, або вимагають застосування спеціальних дорогих реагентів, що істотно ускладнює їх використання в клінічній роботі практикуючого лікаря. Найбільш простим, досить інформативним і доступним для лікувально-профілактичних установ є визначення в крові циркулюючих ендотеліальних клітин (ЦЕК) як маркера пошкодження ендотелію судинної стінки [2, 6, 8].

Визначення ЦЕК має велике практичне значення, оскільки дозволяє клініцисту не тільки



проводити ранню діагностику ЕД, а й давати оцінку ступеня її тяжкості, здійснювати контроль над ефективністю проведеної терапії та відкриває перспективи пошуку лікарських препаратів, що володіють специфічною ендотеліопротективною та відновлюючою дією, застосування яких уповільнює або припиняє розвиток каскаду патофізіологічних змін, ініційованих пошкодженням судинної стінки [3].

Мета роботи: оцінити вагомість визначення маркера дисфункції ендотелію шляхом встановлення взаємозв'язків між рівнем циркулюючих ендотеліальних клітин в крові і ступенем ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з АС.

Матеріали і методи: обстежено 110 пацієнтів (96 чоловіків і 14 жінок) із верифікованим діагнозом АС, які знаходились на стаціонарному лікуванні в ревматологічному відділенні Тернопільської університетської лікарні. Критеріями включення були: достовірний, згідно модифікованих Нью-Йоркських критеріїв [2], діагноз АС; інформована згода пацієнта на участь в дослідженні. Критеріями виключення були: вік понад 60 років, наявність псоріазу, хвороби Крона, неспецифічного виразкового коліту, ішемічної хвороби серця, периферичного атеросклерозу, клінічно значущих вад серця (вроджених або набутих), недостатності кровообігу будь-якого генезу, цукрового діабету, важкого ураження печінки (активного гепатиту, цирозу), нирок (амілоїдозу чи іншої патології з розвитком хронічної ниркової недостатності), інших хронічних захворювань у фазі загострення (виразкової хвороби, холециститу, пієлонефриту і т.п.).

Всім пацієнтам, що погодилися взяти участь у дослідженні проводили загальноклінічне стандартне обстеження (загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, ЕКГ, рентгенографія крижово-клубових зчленувань), біохімічний аналіз крові з ліпідограмою та визначенням гострофазових показників, виявлення HLA B-27. Клінічну активність недуги визначали за допомогою індексу активності захворювання BASDAI, функціонального індексу BASFI, метрологічного індексу BASMI, якості життя ASQoL [2].

Визначення рівня циркулюючих ЦЕК в периферичній крові, що вважаються маркером ушкодження і дисфункції ендотелію [4; 9], здійснювалося за методикою J. Hladovec (1978) [3; 9]. Даний метод заснований на ізоляції клітин ендотелію разом з тромбоцитами з наступним осадженням тромбоцитів за допомогою аденозиндифос-

фату. Забір крові в обсязі 5 мл здійснювався з кубітальної вени, як стабілізатор використовувалася 3,8 % цитрат натрію в співвідношенні з кров'ю 1: 9. Для отримання багаті тромбоцитами плазми безпосередньо після забору крові центрифугували 10 хвилин при 2000 об./хв. Потім 1 мл отриманої плазми змішували з 0,2 мл аденозиндифосфату натрію в концентрації 1 мг/мл. Отриману суміш механічно перемішували протягом 10 хв. акуратним струшуванням пробірок, після чого знову центрифугували в вищезгаданому режимі для видалення агрегатів тромбоцитів. Вільний від тромбоцитів супернатант переносили в іншу ємність і центрифугували при 3000 об./хв. протягом 15 хв. для осадження ендотеліальних клітин. Потім надосадову плазму видаляли, а отриманий осад суспендували в 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl. Отриманою суспензією заповнювали камеру Горяєва. Ендотеліальні клітини ідентифікували і підраховували з використанням фазово-контрастної мікроскопії в 2-х сітках камери. Для вираження вмісту ЦЕК в 1 літрі крові отриманий результат, з огляду на співвідношення між кількістю виявлених ендотеліальних клітин і обсягом камери Горяєва, множили на 10^4 .

Для реалізації мети роботи хворих розподілили на групи залежно від форми АС, стану ЕД, використаних методів лікування.

Серед пацієнтів з центральною формою було 69 хворих, з периферичною – 49. Порушення дисфункції ендотелію спостерігалось у 89,78 %. Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) постійно отримували 22 пацієнтів, періодично – 45. Сульфасалазин (ССЗ) або ж метотрексат (MTX) отримували 38 пацієнтів.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили відомими методами варіаційної статистики у пакеті прикладних програм SPSS22 (©SPSS Inc.).

Результати і обговорення. Серед пацієнтів, що погодилися взяти участь у дослідженні, переважна більшість була працездатного віку (середній вік склав $35,9 \pm 17,1$ років) з тривалістю захворювання в середньому $15,9 \pm 8,2$ років (рис.1). Периферична форма недуги встановлена у 41 пацієнта (37,3 %), центральна у 69 (62,7 %). Оцінка перебігу АС свідчила за наявність високого та середнього ступеня активності недуги за практичної відсутності хворих з неактивним або мало активним перебігом. Вивчення рівня ендотеліальної дисфункції показало, що у 47 % спостерігаються її ознаки.



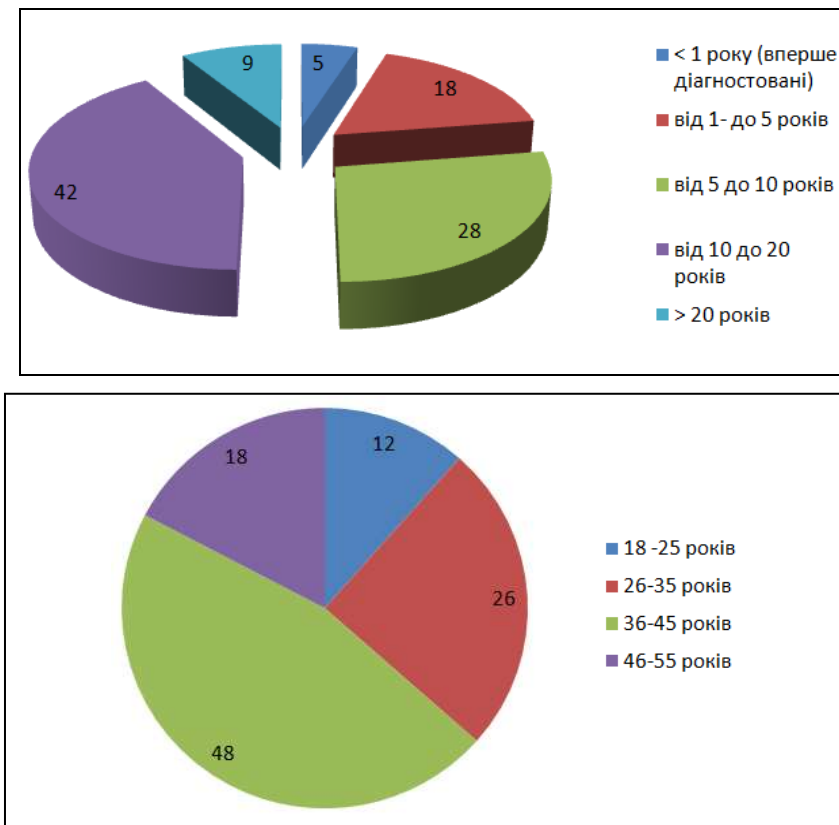


Рисунок 1 – Розподіл пацієнтів за віком і тривалістю захворювання

Проведений аналіз вмісту ЦЕК залежно від рівня ендотеліальної дисфункції показав високі значення (понад $5,0 \cdot 10^4/\text{л}$) у 89,78 % пацієнтів з достовірно визначеною ЕД (ЕЗВД < 10%, $p < 0,05$). При аналізі рівня циркулюючих ендотеліальних клітин (ЦЕК) в периферичній крові встановлено, що серед хворих АС (табл. 1) він

дещо відрізнявся від аналогічного показника у групі контролю. Варто відмітити, що в той же час, наявність конгломератів ЦЕК, котрі є маркером вираженого ушкодження ендотелію, спостерігали у 24 пацієнтів з АС (21,8 %), проти 1 в групі контролю (2,0 %), $p < 0,001$.

Таблиця 1 – Рівень циркулюючих ендотеліальних клітин у хворих на АС і в осіб групи контролю

Показник	Анкілозивний спондилоартрит (n= 110)	Контроль (n = 50)
Рівень ЦЕК, $\cdot 10^4/\text{л}$	$5,5 \pm 0,88^*$	$4,1 \pm 0,42$

Примітка: $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним показником у пацієнтів з групою контролю

Враховуючи вагомий вплив хронічного запального процесу на стан ендотеліальної дисфункції наступним етапом нашої роботи було вивчити рівень ЦЕК за умов різного ступеня активності АС (табл. 2). Для цього усі хворі (n = 110 осіб) були розділені на 3 групи в залежності від рівня активності запального процесу та групи контролю, котру складали здорові особи без обтяженої серцевої патології, шкідливих звичок

та нормальними показниками маркерів запалення. Було встановлено, що при зростанні активності АС прослідковується чітка тенденція до підвищення рівня даного показника. У I групі рівень ЦЕК не відрізнявся достовірно від аналогічного у осіб контрольної групи, але у пацієнтів з I ступенем активності рівень ЦЕК виявився достовірно нижче за аналогічний показник у пацієнтів з II та III ступенем активності АС.



Таблиця 2 – Маркер пошкодження ендотелію у хворих на АС із різним ступенем активності

Показник	Ступінь активності АС (n= 110)			Контроль (n = 50)
	I (n = 18)	II (n = 41)	III (n =51)	
Рівень ЦЕК, 10^4 /л	4,0 ± 0,18 *	4,8 ± 0,38	6,2 ± 0,29	4,1 ± 0,42

Примітка: $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним показником у пацієнтів з II та III ступенем активності

Встановлення взаємозв'язків між параметрами перебігу АС і показником, що вивчався продемонструвало суттєві асоціації, які дозволили констатувати залежність порушення ендотеліальної дисфункції від активності запального процесу (ШОЕ ($r_s = 0,378$, $p < 0,05$), СРБ ($r_s = 0,451$, $p < 0,05$), показник BASDAI ($r_s = 0,369$, $p < 0,05$). Встановлено що у осіб з центральною формою захворювання, котрі постійно отримували НПЗП, рівень ЦЕК незначно перевищував такий же показник у групі контролю. Особи, котрі не отримували протизапальні препарати

або ж отримували їх періодично, мали достовірно вищі показники ЦЕК порівняно з групою контролю. У осіб з периферичною формою найкращі результати демонстрували хворі, котрі отримували базисну терапію в поєднанні з нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП). Проте варто відмітити, що у осіб, котрі не отримували хворобо-модифікуючої терапії (ХМТ) за певних обставин (фінансове питання, непереносимість, відмінна за власним бажанням), а лікувались лише НПЗП, показники ЦЕК були достовірно вищі групи контролю (табл. 3).

Таблиця 3 – Маркери пошкодження ендотелію в залежності від форми захворювання та застосованої терапії

	Форма захворювання					
	Центральна			Периферична		
	Види застосованих препаратів					
Рівень ЦЕК, 10^4 /л	НПЗП		ХМТ		НПЗП (без ХМТ)	НПЗП + ХМТ
	Постійно	Відміна/ 3 перервами	ССЗ	МТХ		
		4,4 ± 0,22*	5,9 ± 0,18*	5,3 ± 0,07	5,7 ± 0,11	6,7 ± 0,79*

Примітка: $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним показником у пацієнтів з центральною та периферичною формами захворювання

Вивчення місця факторів серцево-судинного ризику (ССР) у виникненні ендотеліальної дисфункції свідчив за прямі взаємозв'язки, про що свідчили достовірні дані кореляційного аналізу між індексом атерогенності і вмістом ЦЕК у периферичній крові ($r_s = 0,492$, $p < 0,05$)

Отримані дані підтверджують гіпотезу взаємообтяження тривалого хронічного запалення і ендотеліальної дисфункції та узгоджуються з літературними даними [5; 11].

Висновки

Проведені дослідження дозволяють констатувати значно підвищений рівень ЦЕК у пацієнтів з АС, що реєструються у 84 % випадків. Встановлено, що найчастіше підвищення рівня ЦЕК спостерігається у пацієнтів з II та III ступенем активності. Встановлені суттєві взаємозв'язки між рівнем ЦЕК та індексом атеро-

генності, маркерами активності системного запалення та показником активності АС. Виявлено чітку залежність вмісту ЦЕК у периферичній крові від факту застосування адекватної протизапальної терапії, що підтверджує роль синдрому системної запальної відповіді як нового фактору у розвитку ЕД та підвищенню ССР.



References (список літератури)

1. Braun J., Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007;369(1): 1379–1390
2. Braun J., van den Berg R., Baraliakos X., et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):896–904.
3. Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis-insights into pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):81–91
4. Chen H. A., Chen C H., Liao H.T. et al. Clinical, functional, and radiographic differences among juvenile-onset, adult-onset, and late-onset ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2012;39(5):1013–8.
5. Erre GL, Sanna P, Zinellu A, Ponchietti A, Fenu P, Sotgia S, Carru C et al (2011) Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels and atherosclerotic disease in ankylosing spondylitis: a cross-sectional study. *Clin Rheumatol* 2011;30(2):21–27
6. Heeneman S. Cardiovascular risks in spondyloarthritides. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(2):358–362
7. Kumar A, Falodia SK, Shankar S, Grover R, Marwaha V, Aneja R, Srivastava K, Das N. Assessment of serum nitrite as biomarker of disease activity in ankylosing spondylitis. *Indian J Rheumatology.* 2009; 28(4):47–50
8. McCarey D, Sturrock RD. Comparison of cardiovascular risk in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009; 27(2):124–126
9. D.S. Celermajer, K.E. Sorensen, V.M. Gooch et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 340(2):1111–1115.
10. Poddubnyĭ DA, Rebrov AP. [Endothelial dysfunction in patients with Bechterew's disease (ankylosing spondylitis)]. *Klin Med (Mosk).* 2007;85(2):66–69
11. Syngle A, Vohra K, Sharma A, Kaur L . Endothelial dysfunction in ankylosing spondylitis improves after tumor necrosis factor- α blockade. *Clin Rheumatol.* 2010;29(2):763–770
12. Taurog JD, Chhabbra A, Colbert RA. Axial spondyloarthritis and ankylosing spondylitis. *New Engl J Med.* 2016;26(2):2563–2574.

(received 30.08.2017, published online 29.09.2017)

(одержано 30.08.2017, опубліковано 29.09.2017)

