

Invenția se referă la medicină, în special la cardiologia clinică și experimentală și poate fi aplicată pentru evaluarea afecțiunilor endoteliale a vaselor coronare și capacității lor de regenerare.

Alterarea endotelială a vaselor coronare este cauza oportună a afecțiunilor ischemice ale cordului și insuficienței cardiace, precum și a sindromului coronar acut și a complicațiilor lui fatale: infarctul miocardic acut și tromboembolia. De asemenea afectarea endoteliului contribuie la o remodelare detrimentală a vasului, datorită activării proliferației, hiperplaziei și hipertrofiei structurilor vasculare, fenomene modulate de factorii endoteliali, prin ce și mai mult se amplifică disabilitatea funcțională a bazinului coronar.

Conceptual, alterarea endotelială este determinată de procesul de arterioscleroză, și în special de destabilizarea plăcii ateromatoase, care la rândul său conduce la expansiunea alterărilor endoteliale.

Diagnosticul prompt și veritabil al alterărilor endoteliale a vaselor coronare este o problemă dificilă a cardiologiei, rezolvarea căreia consemnează întreprinderea la timp a măsurilor de profilaxie primară și secundară a evenimentelor coronariene sau corecția conduitei terapeutice existente, având ca scop final ameliorarea calității vieții și a indicilor morbidității și mortalității.

Arsenalul actual al posibilităților de estimare directă sau indirectă a alterării endoteliale a coronarelor însumă următoarele entități:

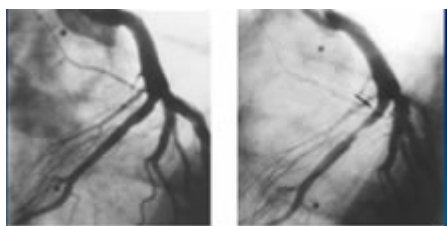
Determinarea serică a fibrinogenului și a D-dimerului, ca markeri ai tulburării hemostazei și are o semnificație estimabilă similară metodei precedente [1].

Determinarea serică a homocisteinei, ca un marker al trombogenezei [2]. Conceptual este validat rolul activării sistemelor celular și umoral de inducere a perturbărilor reologice a sângelui în patogenia afecțiunilor endoteliale, inclusiv coronare. Testul respectiv posedă o informație relativă doar despre un factor de risc al afectării endoteliale determinate de dezaranjamentele hemostazei.

Determinarea serică a colesterolului (LDL, VLDL, HDL) și a proteinei C reactive, ca markeri biochimici ai aterosclerozei [3].

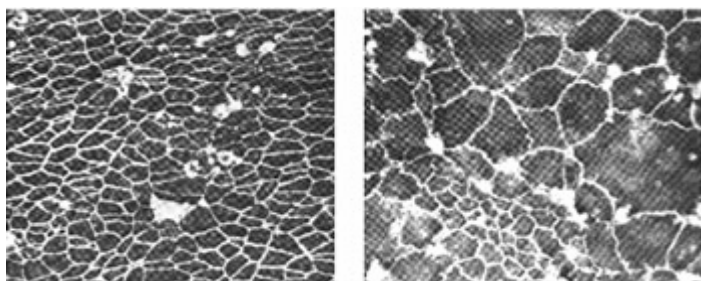
Dezavantajele constau în aceea că are un caracter prolix referitor la gradul de afectare aterosclerotică a endoteliului vaselor coronare, nu corelează autentic cu gradul disabilității endoteliale și nu apreciază potențialul sistemului natural celular reparativ al endoteliului. Totodată acești markeri au o specificitate și o sensibilitate relativ joasă, deci pot avea valori neînsemnat deviate de la normă în prezența unei ateroscleroze coronare notabile, mai ales când ultima se datorează cu precădere tulburărilor hemostazei.

Coronarografia, o metodă invazivă, informativă în vederea aprecierii topografice a alterărilor coronare și a gradului de stenoză, dar care nu indică despre capacitatea de regenerare a endoteliului coronar și endocardic. Totodată, este o metodă traumatică și foarte costisitoare. La pacienții cu afecțiuni endoteliale coronariene atestate prin coronarografie (A2 – ramura arterei coronaria sinistra este cu elemente de obstrucție și degenerescență aterosclerotică asociată de injurii endoteliale) am depistat după metoda propusă diminuarea semnificativă a numărului de celule endoteliale predecesoare (progenitoare) circulante. Aceasta se corelează și cu evidențele morfologice obținute de noi în examenul ultrastructural al biotatelor endoteliale coronariene – B2 – endoteliocitele sunt structural dezaranjate, estropiate, cu spații interendoteliocitare majorate [4]. Dar, de menționat, că coronarografia nu permite de a evalua capacitatea virtuală de reparare a defectelor coronariene, deci de a oferi sugestii de prognoză și de optimizare a conduitei terapeutice. Acest deziderat poate fi rezolvat prin metoda propusă, fiind la această conotație determinată abilitatea celulelor endoteliale progenitoare (predecesoare) circulante de adeziune și proliferare în cultură de celule.



A1-normal

A2



B2-normal

B2

Deci, toate acestea metode sus menționate, care astăzi reprezintă eșalonul întâi în diagnosticul afecțiunilor endoteliale nu oferă posibilitatea de apreciere a capacității sistemului celular de reparare a defectelor endoteliale, care este

reprezentat în mod natural de celulele endoteliale predecesoare (CEP). Deci, nu posedă valoare prognostică și un sufragiu concludent pentru direcționarea conduitei terapeutice în vederea obținerii unui reviriment notabil în acest sens. Problema pe care o rezolvă invenția constă în aceea că afecțiunile coronariene sunt determinate de alterarea endoteliului coronarian care facilitează remodelarea detrimentală a vaselor inimii și care anticipează evoluția simptomatică a maladiei, fiind totodată cel mai fidel predictor al prognozei ei. Evaluarea diagnostică a leziunilor coronariene este o problemă de alertă a cardiologiei și care impune necesitatea unor teste de apreciere și a potențialului de regenerare a injuriilor coronariene pentru corecțiile adecvate ale măsurilor de profilaxie secundară și terțiară. Metoda propusă este o metodă neinvazivă, care evidențiază afectările vaselor coronariene și totodată pronosticul afecțiunilor prin determinarea numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge și numărului de celule vii în cultură.

Esența invenției constă în determinarea numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge, precum și în determinarea in vitro a valorii procentuale de celule aderate la substratul celular și numărului de celule vii în cultură la a 7-ea zi și, în cazul în care valorile respective obținute sunt mai mici de 65 celule/mL, 84% și 350 celule/mm², se constată o afectare a unei sau două artere coronare și o capacitate scăzută de regenerare a afecțiunilor endoteliale.

Rezultatul invenției constă în stabilirea numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge și numărului de celule vii în cultură, care determină un tablou mai evident a afecțiunilor vaselor coronariene și totodată este o metodă de explorare in vitro (este necesar doar sângele pacientului) care nu invocă careva complicații pacientului.

Ansamblul de elemente necesare pentru obținerea rezultatului garantat de invenție:

1. Prezența liganzilor pentru markerii hematopoietici (CD34, CD14, CD 133), cât și pentru markeri endoteliali (VEGFR2-receptorul sau Flk1/KDR, CD31- receptor pentru PECAM) pentru identificarea CEP din sângele pacientului. Acești liganzi pot fi procurați de la diferite firme și companii biomedicale, dat fiind că ei sunt comercializați și utilizați într-o gamă foarte variată de bioestimare a diferitor celule ce posedă markerii susnumiți.
2. Echipamentul tehnic necesar în acest sens este compatibil cu posibilitățile noastre și a altor centre medicale autohtone.
3. Echipamentul tehnic standard de investigare a CEP identificate prin liganzii menționați în cultură de celule, care este de asemenea compatibil cu posibilitățile noastre și a altor centre medicale autohtone.

Încă 40 ani în urmă s-a consemnat fenomenul de creștere a endoteliului sub acțiunea unor componente ale sângelui (Stump M.M., Jordan G.L., Debakey M.E., Halpe T.B. Endothelium grown from circulating blood on isolated intravascular Dacron Hub. *Am J Pathology*, 1963, 43, 361-367). Actualmente s-a precizat în acest context rolul CEP. Ele au origine medulară și se consideră că sunt originare de hemangioblastul măduvei oaselor, celula primară embrionară, și sunt stocate în sinusurile capilare din măduvă. CEP, astfel, conțin atât markeri hematopietici (CD34, CD14, CD 133), cât și markeri endoteliali (VEGFR2-receptorul sau Flk1/KDR, CD31- receptor pentru PECAM, molecula de adeziune endotelială a plachetelor, expresată pe celulele endoteliale coronare și cardiace). Sechestrarea lor în sânge se produce sub acțiunea diferitor stimuli, eliberați cu predilecție în condiții de hipoxie, ischemie, stress, activarea sistemului neuroendocrin și citokinic, printre ei VEGF, fiind recunoscut ce mai potent factor. Luând sediul în locul defectului endotelial coronar (mecanismele acestui fenomen nu sunt încă pe deplin cunoscute) CEP diferențiază, proliferază și preiau fenotipul celulelor endoteliale mature, asigurând astfel creșterea stratului endotelial, regenerarea alterației și restabilirea funcției respective. Acest proces natural se desfășoară încontinuu, dar în diferite condiții patologice procesul de regenerare a stratului endotelial este deapreciat, fapt ce poate rezulta din:

- eliberarea subdenivelată a CEP din miezul osos hematopoietic;
- micșorarea capacității lor de aderare la endoteliocitele alterate în baza expresiei joase a markerilor endoteliali de pe suprafața CEP sau a moleculelor de adeziune intercelulară de pe suprafața endoteliocitelor;
- capacitatea proliferativă precară a CEP, care fiind totuși aderate și cantonate în locul alterării vasului coronar demonstrează un coeficient de diviziune celulară jos și deci o creștere slabă a endoteliului. În acest context se poate prezuma și prezența unui fenotip endotelial strupiat, deci cu o abilitate joasă de sinteză a monoxidului de azot (NO), factorul endotelial oportun în modelarea proceselor de remodelare vasculară și cardiacă.

De menționat că injecția CEP la animale cu diferite modele de ischemie cardiacă a crescut neovascularizația (Carmen Urbich, Stefanie Dimmeler. Endothelial progenitor cells. *Functional characterization*. // *Trends Cardiovasc Med*, 2004, 14, 2-318)

Așadar, este evident, că determinarea indicelui numeric al CEP circulante în sânge la pacienții suspecți la afecțiuni endoteliale coronare poate fi o metodă originală și de mare considerație în plan de evaluare a gradului de afectare endotelială a coronarelor, dacă în realitate se consemnează o corelație semnificativă a modificărilor lui cu alterările structurale coronare atestate prin cea mai informativă metodă actualmente de diagnostic în acest sens, coronarografia. Și tot atât de important este evaluarea indicelui funcțional a CEP circulante (i.e. capacitatea lor de aderare și proliferare) de asemenea în corelație cu profunzimea alterărilor coronariene în examenul de coronarografie, dat fiind că perturbările acestui indice aduc la apel capacitatea diminuată a regenerării endoteliale, chiar dacă indicele numeric nu suportă devieri considerabile.

Aceste opțiuni conceptuale au consemnat esența metodei propuse. Interesul față de studiul indicilor cantitativ și funcțional al CEP a fost inițial determinat de creșterea numerică marcată a acestor celule în sânge la pacienții cu tumori, ce conduce la o angiogeneză sporită, producție exagerată de NO și hiperemie arterială regională marcată, rezultantă într-o aprovizionare elevată cu oxigen a creșterii necontrolate a celulelor tumorale (Vajkoczy P., Blum S., Lamparter M., et

al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med*, 2003, 197, 1755-1765).

Material și metode.

La 24 pacienți (bărbați, vârsta cuprinsă între 42-54 ani; 49 ± 4) cu alterare endotelială coronară documentată prin coronarografie s-a estimat indicele numeric al CEP după metoda astăzi acceptată (Quirici N., Soligo D., Caneva L. et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133⁺ celsl. *Br J Haematol*, 2001, 115, 186-94).

Indicele funcțional al CEP s-a estimat în cultură de celule, fiind la această conotație apreciată capacitatea de aderare după procentul CEP atașate de substratul cultural, precum și capacitatea de proliferare după numărul CEP la ziua 7-ua de cultură în 1 mm² (Quirici N., Soligo D., Caneva L. et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133⁺ celsl. *Br J Haematol*, 2001, 115, 186-94).

Lotul de referință l au constituit 15 persoane sănătoase, bărbați, aproximativ de aceeași vârstă (48 ± 5 ani), la care în aceeași manieră s-au determinat indicii numeric și funcțional al CEP.

Rezultate obținute.

1. Caracteristica indicelui cantitativ (tabelul 1).

Numărul de celule endoteliale predecesoare circulante în sânge la persoane sănătoase și la pacienții cu afecțiuni endoteliale coronare și corelarea celui din urmă cu numărul de artere coronare alterate

Tabelul 1

Indice	Persoane sănătoase n=15	Pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare n=24	Coeficientul de corelare cu numărul de artere coronare alterate
Numărul CEP (CD34+/VEGF2+) în 1 ml sânge	86,67±21,72	35,76±24,13 p<0,006	r= -0,602 p<0,05

La pacienții cu afecțiuni coronare numărul de CEP este concludent redus (mai mult de 2 ori, p<0,006) în sânge vs persoanele sănătoase. Important de menționat că declinul lor cantitativ este în corelație semnificativă (r = -0,602, p<0,05) cu numărul arterelor alterate decelate în angiografie.

Deci, la pacienții cu alterare coronariană numărul micșorat al CEP circulante poate fi o cauză concludentă a remodelării detrimentale a vaselor coronare, cel puțin în temeiul unui substrat celular redus de reparație a endoteliului, iar depistarea acestui fenomen este o opțiune diagnostică autentică a profunzimei alterărilor vasculare în bazinul coronarian.

2. Caracteristica indicelui funcțional (tabelul 2). Ea este foarte importantă, deoarece, după cum s-a menționat mai sus decrementul numeric poate fi compensat printr-o capacitate de adeziune și proliferare potentă.

Valorile indicelui funcțional al celulelor endoteliale predecesoare în cultură reluate de la persoane sănătoase și de la pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare și corelarea celor din urmă cu numărul de artere coronare alterate.

Tabelul 2

Indice	Persoane sănătoase n=15	Pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare n=24	Coeficientul de corelare cu numărul de artere coronare alterate
Procentul CEP atașate de substratul celular	92,07±8,1	52,72±25,8 p<0,00142	r=- 0,695 p<0,05
Numărul CEP în cultură/1 mm ² la ziua 7	496,66±146,99	94,88±35,53 p<0,0009	r=- 0,716 p<0,05

2.A. Capacitatea de adeziune a CEP la pacienții cu afecțiuni coronare este semnificativ diminuată, procentul celulelor aderante fiind cu 43% deapreciat vs indicele de referință. Acest indice de asemenea corelează semnificativ cu numărul de artere coronare afectate (r=-0,695, p<0,05).

2.B. Capacitatea proliferativă a CEP de la pacienții cu afecțiuni coronare este de circa 4 ori mai slabă (p<0,0009) și corelează semnificativ cu numărul de artere coronare alterate (r=- 0,716, p<0,05).

Deci, la pacienții cu alterare coronariană micșorarea numărului CEP circulante este asociat de abilitatea lor notabil redusă vis-a-vis de aderarea la sediul în regiunile alterative ale coronarelor (în mod natural anume aici crește expresia diferitor molecule de adeziune intercelulară de captare a CEP circulante), precum și de proliferare, necesară pentru asigurarea creșterii ulterioare a endoteliului structural afectat. Astfel valoarea joasă a indicelui funcțional indubitabil indică despre o capacitate subminată de regenerare a endoteliului coronar despre ce elocvent consemnează și corelarea semnificativă cu numărul arterelor coronare afectate. Această evidență fortifică valoarea diagnostică a indicelui cantitativ și oferă informație autentică despre regenerarea virtuală a endoteliului, fapt ce constituie avantajul oportun față de metoda de aur de diagnostic a injuriilor coronare și însumă sufragii argumentate referitor la corecția terapeutică imprimis prin administrarea remediilor ce augmentează aderarea și proliferarea ECP, e.g. statine și estrogeni. Cu toate acestea metoda propusă este incomparabil mai ieftină față de coronarografie, dat fiind costul unei probe estimat la circa 1500 lei și poate fi efectuată la o instruire rapidă în acest sens a specialiștilor.

Opțiuni de interpretare a datelor obținute prin metoda propusă

1. Gradul de micșorare a indicelui numeric al EPC în sânge față de valoarea lui normală acceptată de noi prin această metodă (circa 90 celule/ml) indică în proporții directe gradul de afectare endotelială a coronarelor, i.e. numărul de artere coronare alterate.
2. Dacă la aceasta se asociază și diminuarea capacității de adeziune a CEP în cultură se semnifică tulburarea în condiții naturale a sediului CEP circulante și cantonarea lor în zona alterării endoteliale a coronarelor și ca repercusiune se evidențiază o posibilitate virtuală redusă de regenerare a endoteliului.
3. Dacă în cultură celulară se decelează capacitatea proliferativă scăzută a CEP se concluzionează despre un randament mic de diviziune celulară în sens reparativ și se evidențiază de asemenea o posibilitate virtuală redusă de regenerare a endoteliului.
4. Evaluarea indicelui cantitativ, și în special a indicelui funcțional, merită a fi o măsură de valoare pronostică ultimativă în estimarea riscului sechelelor coronare dezvoltate după Bypass coronarian, imprimis restenozarea.
5. Metoda propusă poate fi utilizată în diagnosticul și prognozarea acțiunilor dărmtoare ale factorilor de risc a afecțiunilor cardiovasculare: diabetul zaharat, dislipidemiile, fumatul, sindromul metabolic X, hipodinamia.

Exemplul 1

Pacientul N., 47 ani, suspectat la afecțiune endotelială coronară.

Estimări: 1. Examenul de coronarografie indică despre afectarea a 2 artere coronare ale arterei descendente stângă. 2. Nivelul colesterolului total sanguin la limita de sus admisibilă (5,45 mmol), iar proteina C-reactivă în valori normale. 3. Nivelul homocisteinei și a fibrinogenului - normal. 4a. Numărul de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în 1 ml de sânge se estimează la 21. 4b. Procentul lor de aderare la substratul celular este de 29%, iar numărul lor în cultură la ziua 7-ea se estimează la 69.

Exemplul 2

Pacientul N., 50 ani, suspectat la afecțiune endotelială coronară.

Estimări: 1. Examenul de coronarografie indică despre afectarea unei artere coronare din bazinul arterei diagonale. 2. Nivelul colesterolului total sanguin și proteina C-reactivă în valori normale. 3. Nivelul homocisteinei și a fibrinogenului - normal. 4a. Numărul de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în 1 ml de sânge se estimează la 31. 4b. Procentul lor de aderare la substratul celular este de 44%, iar numărul lor în cultură la ziua 7-ea se estimează la 85.

Concluzie:

La ambii pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare documentate prin coronarografie valorile markerilor standardului diagnostic (colesterolul, proteina C-reactivă, homocisteina, fibrinogen) nu sunt deviate. Prin metoda propusă s-au apreciat valori diminuate ale numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge sub 86 celule/ml (medie normală) și a indicelui funcțional: capacitatea de aderare sub 92% (medie normală) și capacitatea proliferativă sub 490 (medie normală).

Indicii cantitativ și funcțional corelează autentic cu numărul de artere coronare alterate decelate în coronarografie.