



Връзка на MMP-9 с параметри на нарушената сърдечна функция при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност

Д-р Катерина Витлиянова

Катедра по пропедевтика на вътрешните болести „Проф. д-р Ст. Киркович“, Клиника по кардиология, УМБАЛ „Александровска“, Медицински университет, София

През последното десетилетие се натрупаха достатъчно данни в подкрепа на ролята на миокардния извънклетъчен матрикс в поддържането на миоцитната цялост, камерната геометрия и механичната функция. Акумулацията на доказателства води до насочване на изследователския интерес към фамилията от ензими, имащи отношение към патогенезата на левокамерната (ЛК) дисфункция.^{1,2} Матриксните металопроотеинази (MMP) са сложна група от цинкзависими протеази, ендонептидази с важна роля в сърдечно-съдовата физиология и патология, регулиращи синтеза и деградацията на миокардните екстрацелуларни матриксни протеини.

Съществуват лимитиран брой данни за сложната взаимовръзка между MMP, неврехормоналната активация и параметрите на нарушената сърдечна функция при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност (ХСН). Налице е особена нужда от проучвания в тази насока, предвид комплексния характер на активация на MMP. По-доброто разбиране на процесите с участието на MMP в ЛК ремоделиране би позволило дефиниране на пациенти с ХСН в риск. Знанията в тази насока носят потенциална полза от манипулация на активността на ензима и въвеждането на нови терапевтични опции, както и намаляване на възможните рискове при тези пациенти.

Целта на проучването е да се установи връзката на MMP-9 с определени параметри на ЛК дисфункция, както и факторите с прогностичен ефект върху плазмените нива на ензима при пациенти с ХСН.

Материал и методи

Проучването е проведено върху 59 последователни пациенти с ХСН на възраст от 48 до 81 години, средна възраст 69.3±7.9 години, постъпили в Кардиологична клиника на Катедрата по пропедевтика на вътрешните болести, УМБАЛ „Александровска“, Медицински университет, София. Диагнозата ХСН се приема при типична симптоматика, рентгенологични данни за белодробен застои и/или значителен клиничен отговор

на провежданата терапия в съответствие с дефиницията на Европейското кардиологично гружество, 2005 г. Изразената систолната дисфункция на ЛК е дефинирана при стойности на левокамерната фракция на изтласкване (ЛКФИ) <40%.

Контролна група

Контролната група се състои от лица, характеризирани се с подобна на случаите възрастова характеристика: средна възраст 68.7±7.9 години. Всички контроли са разпитани и прегледани обстойно за изключване на патологични отклонения, имащи отношение към резултатите на проучването. Само лица без анамнестични данни за заболяване, отклонения в обективното състояние, с нормален електрокардиографски образ, както и без каквато и да е медикация са включени в контролната група. Общият брой контроли за анализ и сравнение със случаите е 24.

Всички включени в проучването пациенти са разпитани и прегледани по стандартизиран протокол, *Включващи данни от анамнезата и обективния статус*. Продължителността на интервюто и клиничния преглед е 60±30 минути и включва въпроси относно:

1. *Демографски и биологични фактори*: възраст, пол, ръст/тегло,* *индекс на телесна маса (ИТМ)*, систолно и диастолно артериално налягане (САН/ДАН); *сърдечно-съдови рискови фактори*: тютюнопушене (ТН), употреба на алкохол.

2. *Клинични характеристики и провеждана терапия*: етиология на сърдечната недостатъчност (исхемична, неисхемична), придружаващи заболявания [артериална хипертония (АХ), хронична обструктивна белодробна болест (ХОББ), захарен диабет (ЗД), периферна съдова болест (ПСБ)], функционален клас (ФК) по NYHA,** сърдечна честота, ритъмни нарушения, наличие на клинични белези на сърдечна недостатъчност.

* Антропометричните измервания са взети при стартиране на проучването

** Класификация на Ню Йоркската Сърдечна Асоциация

3. *Инструментални данни*

Инструменталните характеристики са изследвани при приемането и включват:

■ Стандартна електрокардиограма от 12 отвеждания

■ Рентгенографско изследване за наличие на увеличени размери на леви сърдечни кухини, плеврален излив, съдов застои, кардио-торакално отношение (<0.6 / ≥0.6).

■ Ехокардиографско изследване с определяне на стойностите на левокамерната фракция на изтласкване (ЛКФИ) в проценти по метода на Simpson в стандартна двукухинна позиция или Teicholds при липса на сегментни ЛК нарушения.

Статистически методи

Количествените показатели са представени като средна величина със стандартно отклонение (SD) за количествените показатели и относителни дялове за качествени променливи. Сравнителният анализ по групи включва провеждането на непараметричен анализ – изчисляване на критерий Хи-квадрат за категориите променливи и параметричен анализ – (ANOVA) анализ (за множествени сравнения на средните величини за даден фактор по категориите на груп фактор), t критерий на Student-Fisher и тесст на Man-Whitney за факторите с разпределение, различно от нормалното.

Оценката на корелационните зависимости между изследваните показатели е осъществена посредством линейно-регресионен анализ с логаритмична трансформация за зависимите променливи с разпределение, различаващо се от нормалното, включително и на зависимата променлива MMP-9.

Показателите САН, ДАН, телесистолен обем (ТСО), теледиастолен обем (ТДО), телесистолен размер (ТСР), теледиастолен размер (ТДР) са изследвани като количествени променливи в линейно-регресионния анализ. Всички останали показатели са анализирани като категориен променливи.

Биохимични показатели

На всички изследвани пациенти, както и на здравите контроли, е взета кръв за биохимичен анализ, включващ кръвна картина, серумни нива на електролити (натрий и калий), креатинин, ензими, липиден статус.

Кръвни проби за мозъчен натриуретичен пептид (BNP) и MMP-9 са взети при изписването на пациентите от клиниката. Определянето на плазмената концентрация на BNP е извършено в лабораторията по Медуко-биологични изследвания, Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, посредством ензимно-свързан имуносорбентен метод (ELISA), чрез готов тесст (BNP-32, IBL Hamburg). Анализът е проведен на ELISA reader на Biolab. Съгласно протокола на производителя, чувствителността на метода за изследване на нивата на BNP, определена като минимална откриваема концентрация, равна на 4

pg/ml. Възпроизводимостта на метода, изразена като вътреопитен коефициент на вариация, е оценена на 5% при коефициентът на вариация между различните опити <14%.

Концентрациите на плазменния MMP-9 протеин са изследвани с ензимно-свързан имуносорбентен метод ELISA (EIA-ELISA assays, ELISA reader Trinitron) в Института по имунология и биология на размножаването – Българска академия на науките. MMP-9 е определена чрез MMP-9 тесст, IBL Hamburg. Според протокола на производителя чувствителността на метода за изследване на нивата на MMP-9 е 0.05 pg/ml. Вътреопитният коефициент на вариация е оценен на 7.3%, докато коефициентът на вариация между различните опити е пог 10.2%.

Резултати

Сравнителен анализ по групи

В табл. 1 са представени изходните параметри на пациентите с ХСН, изследвани за MMP-9.

Групата на пациенти с ХСН и контролната група се различават статистически значимо по стойностите на хемоглобина, общия холестерол, кръвната захар, креатинина и серумните нива на натрий. Статистически сигнификантна разлика между групите се регистрира още за измерените нива на BNP и MMP-9. Меди-

Характеристика	Средни стойности (SD) Медианни стойности (IQR)
Възраст ≥65 години	42 (71.2)
Жени	25 (42.4)
<i>Придружаващи заболявания и РФ</i>	
АХ	49 (83.1)
ЗД	15 (25.4)
ХОББ	10 (16.9)
ПСБ	7 (11.9)
ТН	8 (13.6)
<i>Исхемична етиология на СН</i>	
МИ	28 (47.5) 23 (39.0)
<i>Клинични белези</i>	
Предсърдно мъждене (хронично)	29 (49.2)
САН (mmHg)/ДАН (mmHg)	130 (90–180)/80 (50–100)
Белодробен застои	39 (66.1)
Периферен застои	33 (55.9)
<i>Функционален клас</i>	
II	15 (25.4)
III	16 (27.1)
IV	15 (25.4)
<i>Инструментални данни</i>	
Рентгенологични данни за белодробен застои	35 (59.3)
<i>Ехокардиография</i>	
ТДО (ml)	134 (58–456)
ТСО (ml)	83 (28–311)
ТСО (ml)	25 (42.4)
ЛКФИ <40%	12 (7–16)
ЛКХ скор	47 (30–90)
Систолено налягане в а. pulmonalis	
<i>Терапия при приемането</i>	
АСЕ/АРВ	34 (57.6)
β-блокери	41 (69.5)

Табл. 1. Характеристики при пациенти с ХСН, изследвани за MMP-9



Показател	Пациенти n=53	Здрави контроли n=24	P*
BNP (pg/ml)	650 (401–5974)	57 (35–118)	<0.05
MMP-9 (ng/ml)	1.7 (0.5–7.3)	1.2 (0.6–2.9)	<0.01
ТСН (mmol/l)	4.6 (0.7)	5.3 (0.6)	<0.05
Кръвна захар на гладно (mmol/l)	6.4 (2.3)	5.4 (0.8)	<0.05
Хемоглобин (g/l)	126.5 (19.7)	144 (19.4)	<0.05
Общ билирубин (μmol/l)	17.2 (13.5)	16.2 (9.0)	NS
Креатинин (μmol/l)	126.5 (45.7)	97.7 (35.4)	<0.05
Натрий (mmol/l)	140 (3.7)	144 (3)	<0.05
Левкоцити (*10 ⁹ /l)	7.8 (2.1)	7.0 (1.6)	NS
СРК (U/l)	93.9 (65.2)	71.1 (27.8)	NS

Табл. 2. Сравнителен анализ между пациенти с ХСН и здрави контроли

Стойностите са представени като средна величина със SD, медиана с IQR, в зависимост от вида на данните; * Манн-Уитни U-test

анната стойност на случаите (1.7, диапазон 0.5–7.3) е сигнификантно по-ниска в сравнение с установената медианна MMP-9 стойност на контролната група (1.2, диапазон 0.6–2.9) при високо ниво на статистическа значимост (p=0.01) (табл. 2).

Връзка на MMP-9 с инструменталните и клиничните параметри при ХСН

Еднофакторният линейно-регресионен анализ показва сигнификантна линейна зависимост между зави-

Характеристика	R ²	F	B	P
Възраст >65 години	0.00	0.02	0.02	NS
Жени	0.13	0.02	0.15	NS
Придружаващи заболявания и РФ	0.01	0.28	-0.11	NS
Артериална хипертония	0.06	3.61	0.13	0.06
Захарен диабет	0.06	3.58	-0.36	0.06
ХОББ	0.02	0.96	0.22	NS
ПСБ	0.00	0.04	-0.04	NS
Тютюнопушене				
Исхемична етиология на СН	0.02	1.18	0.16	NS
МИ	0.02	0.59	0.12	NS
Клинични белези				
Предсърдно мъжгене (хронично)	0.07	4.35	-0.30	0.042
САН (mmHg)	0.07	4.18	0.007	0.046
ДАН (mmHg)	0.01	0.37	0.004	NS
Белодробен застои	0.01	0.30	0.08	NS
Периферен застои	0.00	0.00	0.01	NS
Функционален клас (II спрямо III–IV)	0.00	0.13	-0.06	NS
Инструментални данни				
Рентгенологични данни за белодробен застои	0.00	0.20	0.07	NS
Ехокардиография				
ТДО (ml)	0.00	0.10	-0.07	NS
ТСО (ml)	0.08	2.15	-0.33	NS
ЛКФИ <40%	0.12	8.55	-0.43	0.005
ЛКХ скор*	0.09	5.21	0.09	0.027
Систолично налягане в a. pulmonalis	0.00	0.43	0.00	NS

Табл. 3. Еднофакторен линейно-регресионен анализ

*ЛКХ скор = дебелина на задна стена на ЛК+дебелина на септум/2

Характеристика	R ²	F	B	P
Хемоглобин (g/l)	0.003	0.16	0.002	NS
Хематокрит	0.005	0.28	0.69	NS
Левкоцити (*10 ⁹ /l)	0.020	1.04	0.04	NS
Креатинин (μmol/l)	0.028	1.49	-0.20	NS
Натрий (mEq/L)	0.029	1.53	0.03	NS
Калий (mEq/L)	0.006	0.31	0.09	NS
СРК (U/l)	0.061	2.71	-0.002	NS
BNP pg/ml	0.016	0.81	-0.10	NS

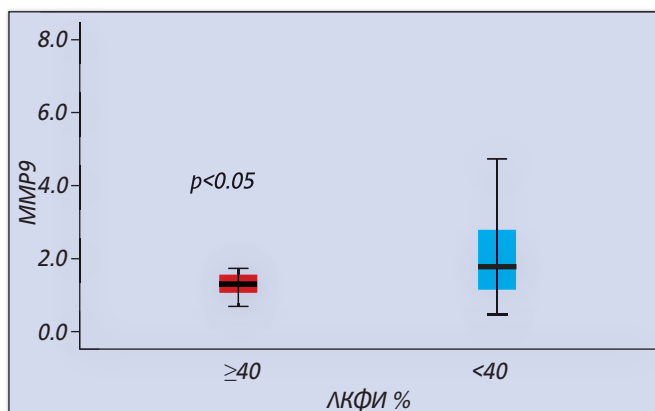
Табл. 4. Еднофакторен линейно регресионен анализ (лабораторни показатели)

симата променлива MMP-9 и наличието на данни за предсърдно мъжгене. Стойностите на систолното артериално налягане, ЛКФИ и дебелината на ЛК миокард, измерена като ЛКХ скор, имат определящо значение върху периферните нива на MMP-9 (табл. 3, 4).

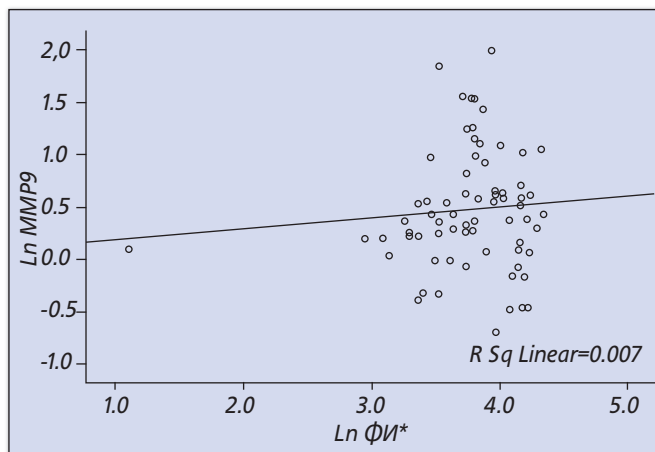
Не се установяват значими корелационни зависимости с етиологията на ХСН. Изследваните лабораторни показатели са с несигнификантен прогностичен ефект по отношение на стойностите на MMP-9. Резултатите показват липса на прогностичен ефект на левкоцитния (leu) брой и нивата на креатинфосфокиназата (СРК) (табл. 4).

Липсва сигнификантна връзка между стойностите на MMP-9 и BNP при наличие на силна зависимост между BNP и стойностите на ЛКФИ от една страна и MMP-9 и ЛКФИ от друга (фиг. 1, 2, 3, 4).

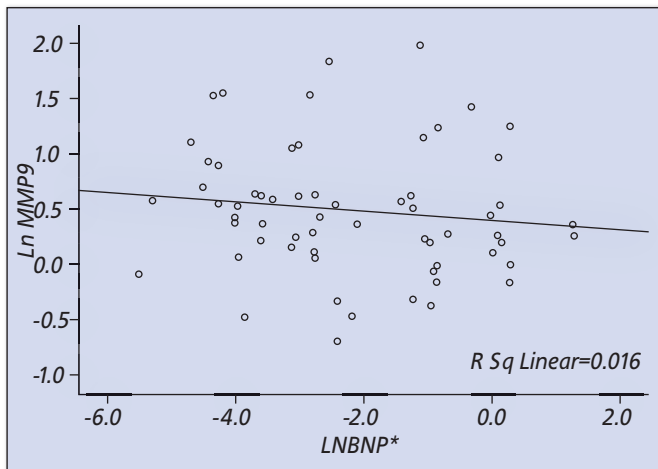
При пациенти с ХСН и придружаващ захарен диабет (ЗД) и хронична обструктивна белодробна болест



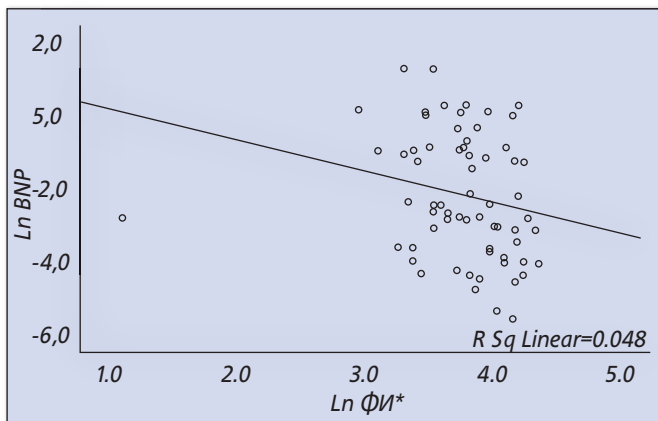
Фиг. 1. Сравнителен анализ на MMP-9 по категориите на ЛКФИ



Фиг. 2. MMP-9 като функция от ЛКФИ (lnЛКФИ); *p<0.01



Фиг. 3. MMP-9 като функция от BNP lnBNP; *p>0.05



Фиг. 4. lnBNP като функция от lnPhi; *p<0.01

MMP-9	ЗД	ХОББ	Исхемична етиология	САН	ЛКФИ	ЛКХ скор	Leu	СРК	BNP
R*	0.25	-0.24	0.15	0.26	-0.37	0.42	0.14	-0.25	-0.13
P	0.03	0.03	NS	0.02	0.003	0.001	NS	0.054	NS

Табл. 5. Корелационни коефициенти на връзката между MMP-9 и изследваните показатели

*R корелационен коефициент – Spearman корелация

Характеристика	R2	F	B	P
Предсърдно мъждане	0.507	7.71	-0.345	0.008
САН			0.011	0.001
ЛКФИ			-0.43	0.002
ЛКХ скор			0.011	NS
Захарен диабет			0.136	NS
ХОББ			-0.557	0.002

Табл. 6. Многофакторен линейно регресионен анализ

(ХОББ) нивата на MMP-9 са сигнификантно зависими от коморбидността с тези заболявания (табл. 5).

В многофакторния линейно-регресионен анализ за определяне на детерминантите на MMP-9 са включени всички фактори с ниво на статистическа значимост p<0.10. Многофакторният анализ установява независим ефект за ПМ, САН, ЛКФИ и ХОББ (табл. 6).

Дискусия

Една от най-значимите последици върху прогнозата след остър миокарден инфаркт (ОМИ) е развитието на неблагоприятно ЛК ремоделиране. Степента на ремоделация и степента на промените в ЛК обеми респек-

тивно корелират силно с тежестта на ЛК дисфункция, и вероятността за развитие на ХСН. В експериментални модели с животни с ОМИ селективната MMP инхибиция води до намаляване на изтъняването на ЛК стена и дилатацията, което съответства на установената от нас корелационна зависимост между MMP-9 и дебелината на ЛК. В потвърждение на този резултат в проучването Framingham Study при индивиди без прекаран ОМИ или ХСН установените плазмени нива на MMP-9 са корелирали с ЛК размери и дебелина, но само при лица от мъжки пол.⁴ Според нашите резултати MMP-9 има отношение към прогресията на ХСН както при жени, така и при мъже, предвид установения от нас несигнификантен статистически ефект на пола върху нивата на MMP-9.

Според някои автори MMP заемат важна роля в патогенезата на заболяванията, етиологично свързани с ТН, чрез медиация на индуцираната от този фактор инфилтрация с клетки на възпалението в белогробната тъкан. Още повече, както MMP-9, така и MMP-2 са повишени при експерименти върху животни с моделиран емфизем.⁴ Резултатите относно връзката между MMP-9 и изследваните РФ не установяват зависимост с ТН, установена от други автори и изразяваща се в по-ниски стойности на ензима при пушачи. Наблюдава се обаче независим прогностичен ефект на ХОББ върху нивата на MMP-9 след включване на останалите сигнификантни детерминанти в многофакторния анализ, изискващо допълнителни проучвания на нивата на MMP-9 при пациенти с ХОББ. Въпреки наблюдаваният несигнификантен ефект на ТН върху MMP-9 е важно да се отбележи значителното превалиране на този фактор в групата с ХОББ (30.0%, спрямо 10.2%) в сравнение с относителния дял пушачи в групата пациенти без ХОББ, въпреки изключително ниския брой пушачи в изследваната група пациенти. Наблюдаваната негативна корелационна зависимост между ХОББ и MMP-9 може да бъде обяснена с по-висока степен на включване на ензима в патологични процеси, свързани с белогробното тъканно възпаление при тези пациенти.

Не се регистрира сигнификантна зависимост между VNP и MMP-9, но се отбелязва особеност, изразяваща се в негативен характер на установената незначима корелация, което съвпада с наблюденията на Kelly и сътр. (2007). В проучването на Kelly и сътр. комбинацията от ниски VNP с по-високи концентрации под формата на плато на MMP-9 води до относително запазване на ЛК функция и по-ниска степен на ремоделиране при пациенти след ОМИ.⁵

В едно от първите проучвания, изследващи MMP-9 при 51 пациенти с ХСН и сравнителен анализ с 52 здрави контроли, Altieri и сътр. (2003) установяват повишена активност както на MMP-9, така и на тъканен инхибитор на металопротеиназите -1 (TIMP-1) в плазма на пациенти с ХСН. Авторите не установяват връзка между ФК и стойностите на MMP-9, което е в съответствие с нашите резултати за липса на корелация между ФК и изследвания ензим.⁶



При пациенти с различни сърдечно-съдови заболявания плазмената MMP-9 предсказва риска от фатална коронарна болест.⁷ Както беше отбелязано, плазмената MMP-9 се повишава след МИ. Противоположно на очакванията, не се наблюдава ефект на доказана исхемична болест на сърцето, включително преживян МИ, върху стойностите на MMP-9. В потвърждение на отчетения от нас резултат по отношение на етиологията, Spinale и сътр. (2000) установяват, че MMP-9 е повишена при пациенти с дилатативна кардиомиопатия, независимо от етиологията на ХСН.⁶ Нашите резултати не потвърждават установената от други автори зависимост между MMP-9 и левкоцитния брой и стойностите на креатинфосфокиназата при пациенти с ХСН, наблюдавана в преродни проучвания при пациенти с ОМИ.

В заключение, пациентите с ХСН са с по-високи

стойности на MMP-9 в сравнение със здрави контроли, следствие вероятно от участието на ензима в специфичен и *персистиращ* за ХСН процес на екстрацелуларно ремоделиране. Стойностите на MMP-9 при ХСН са значително по-ниски в сравнение с измерените в други проучвания плазмени концентрации на ензима при пациенти с остър коронарен синдром, например. Наблюдаваните промени са независими от пола и възрастта. MMP-9 е в тясна зависимост с ЛК функция и гебелината на ЛК стена. Стойностите на MMP-9 са повишени при пациенти с ХСН, независимо от неврохормоналната активация при липса на сигнификантна зависимост между VNP и ензима. Независими предиктори на повишените MMP-9 нива са САН, ПМ, ЛКФИ, както и данни за придружаваща ХОББ. Необходими са допълнителни проучвания, включително популационни, за изясняване на ролята на MMP-9 при пациенти с ХСН.

Книгопис

1. Thomas C.V., Coker M.L., Zellner J.L., Handy J.R., Crumbley A.J., Spinale F.G. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998; 97:1708–1715.
2. Banfi C., Cavalca V., Veglia F., et al. Neurohormonal activation is associated with increased levels of plasma matrix metalloproteinase-2 in human heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26:481–488.
3. Mukherjee R, Widener C, Brinsa T, Dowdy KB, Scott AA, Sample J, Hendrick J, Escobar G, Joffs C, Lucas D, Zile M, Spinale F. Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation* 2003; 107:618–625.
4. Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, Siwik DA, Colucci WS, Sutherland P, Wilson PWF, Vasan RS. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures. *Circulation* 2004; 109:2850–2856.
5. Yarbrough WM, Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Escobar GP, Joffs C, Lucas DG, Crawford FA, Spinale FG. Matrix metalloproteinase inhibition modifies left ventricular remodeling after myocardial infarction in pigs. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2003; 125:602–610.
6. Frantz S, Störk S, K. Michels, M. Eigenthaler, G. Ertl, J. Bauersachs, C.E. Angermann. Tissue inhibitor of metalloproteinases levels in patients with chronic heart failure: An independent predictor of mortality. *Eur J Heart Fail* 2008; 10 (4):388–395.
7. George J, Patal S, Wexler D, Roth A, Sheps D, Keren G. Circulating matrix metalloproteinase-2 but not matrix metalloproteinase-3, matrix metalloproteinase-9, or tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predicts outcome in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 2005; 150 (3):484–7.
8. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 109:1579–1585.