

Н.А. Рыжкова

КИСЛОРОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

ННЦ "Институт кардиологии
имени акад. Н.Д. Стражеско" НАМН Украины,
отделение иммунологии, г. Киев

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) относят к эффекторам воспаления, реактивность которых определяет инициацию, развитие и результат воспалительного процесса в каждом конкретном случае. В отличие от других клеток, НГ хорошо переносят гипоксию и могут осуществлять свойственные им физиологические функции даже в условиях анабиоза. НГ являются основными источниками кислородных радикалов в организме человека. Внезапность и скорость, с которой возникают и развиваются реакции образования мощных биооксидантов, послужили поводом для образного сравнения их со взрывом (респираторный взрыв). Реакции респираторного взрыва не являются системой жизнеобеспечения НГ. Этим путем они осуществляют свои эффекторные функции. Активированные НГ во время респираторного взрыва генерируют супероксиданион (СОА), который образуется при участии НАДФ-оксидазы. В дальнейшем образуется перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород и гидроксильный радикал. H_2O_2 в комбинации с миелопероксидазой (МПО) формирует ферментно-субстратный комплекс, который окисляет ионы галогенов (Cl⁻, I⁻, Br⁻) и образует высокореакционные агенты, в частности гипохлорную кислоту [4].

Поддержание на определенном уровне активных форм кислорода (АФК) клеток важно для регуляции нормальных физиологических процессов в организме: уровня врожденной и приобретенной иммунной защиты, уровня периферического сосудистого тонуса, уровня самообновления мембран клетки, сохранности механизма апоптоза; кислородные радикалы участвуют в процессах рецепторной регуляции клетки, в ряде других физиологических процессах [7, 9]. Нарушения антиоксидантной системы и АФК, в той или иной мере, возможно при любых формах

патологии, поэтому контроль антиоксидантной активности тканей и генерации АФК является важной формой общепатогенетического лечения и профилактики широкого спектра заболеваний. Характерными примерами свободнорадикальной патологии являются атеросклероз, ишемия, инфаркт миокарда. Однако, в литературе встречаются данные только об отдельных звеньях кислородного метаболизма НГ, лишь частично отображающих состояние клетки, нет комплексных исследований этого процесса [2].

Поэтому целью нашей работы было изучить различные этапы кислородного метаболизма НГ у больных с различными проявлениями ишемической болезни сердца (ИБС) и оценить его значение для данной патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было обследовано 20 практически здоровых лиц, 50 больных со стабильным течением ИБС (средний возраст $55,9 \pm 0,7$ лет) и 62 больных (средний возраст $54,3 \pm 1,2$ лет) с острым коронарным синдромом (ОКС) с элевацией сегмента ST на ЭКГ при поступлении в стационар до начала лечения (среднее время от начала болевого синдрома $3,13 \pm 0,26$ ч), в частности реперфузионной терапии, и в динамике лечения на 7 сутки пребывания больного в стационаре.

Кислородный метаболизм НГ оценивали по уровню супероксиданиона (СОА), содержанию H_2O_2 , активности МПО и каталазы в клетках. Работу проводили с чистой популяцией НГ, которую получали на двойном градиенте плотности фиколл-верографина (1.076 и 1.120) и доводили до концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл питательной среды. Реакции ставили в плоскодонных полистироловых планшетах. Активность СОА оценивали по количеству образовавшегося диформаза в результате восстановления нитросинего тетразолия. Активность МПО НГ определяли в бензидиновой реакции — в присутствии МПО бензидин окисляется перекисью водорода с образованием синей окраски. Определение содержания H_2O_2 и активности каталазы основано на способности H_2O_2 образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс желтого цвета. Содержание H_2O_2 в НГ вычисляли по калибровочной кривой [1]. Активность каталазы оценивали по степени разрушения H_2O_2 . Результат реакций учитывали на иммуноферментном анализаторе iEMS Labsystems (Финляндия) при длине волны 405 нм [5]. Связь между оптической

плотностью (экстинцией) и концентрацией вещества в изучаемом растворе описывает закон Бугера–Ламберта–Бэра [3].

Подсчет форменных элементов крови проводили на аппарате “Advia” (Австрия) в клинической лаборатории ННЦ “Институт кардиологии имени академика М.Д. Стражеска”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Полученные результаты показали, что у больных ИБС, на первый взгляд, кислородный метаболизм не зависел от характера течения данной болезни. В целом по представленным группам у пациентов достоверно снижена активность СОА и МПО, тогда как содержание Н₂О₂ и активность каталазы была в пределах нормальных величин (табл. 1).

Однако при более детальном анализе было выявлено, что у больных с ОКС показатели кислородного метаболизма НГ имели широкий разброс данных. В связи с этим мы разделили пациентов на 2 группы в зависимости от исходного уровня активности СОА, поскольку он играет ключевую позицию в молекулярных трансформациях кислорода и связанную с этим наработку

последующих кислородных радикалов. 1 группу составили больные с низкой активностью СОА (33 человека — 46%), 2 группу — с нормальной активностью СОА (39 человек — 54%). У больных ИБС высокая активность СОА практически не встречалась. В обеих группах больные были сопоставимы по возрасту, полу, индексу массы тела, времени от начала инфаркта.

При рассмотрении показателей кислородного метаболизма НГ установлено (табл. 2), что у больных 1 группы низкими были не только активность СОА, но и все остальные факторы кислородного метаболизма (активность МПО и каталазы, содержание Н₂О₂). Более того, в динамике наблюдения на 7 сутки картина практически не менялась. Тогда как во 2 группе все изучаемые показатели были в пределах контрольной группы как в 1 так и на 7 сутки пребывания больного в стационаре.

Представленные группы больных различались и по абсолютному количеству НГ, которое у больных 1 группы достоверно выше (9,4±0,6)·10⁹/л, чем во 2 группе (8,4±0,3)·10⁹/л, в норме — (3,1±0,1)·10⁹/л (p<0,05). Значение раннего увеличения числа лейкоцитов для ухудшения течения

Таблица 1

Показатели кислородного метаболизма нейтрофильных гранулоцитов у больных с различными проявлениями ишемической болезни сердца

Показатели	Контрольная группа (n=20)	Стабильная стенокардия (n=50)	Острый коронарный синдром (n=62)	
			1 сутки	7 суток
Активность СОА, ммоль/л	6,3±0,6	5,0±0,3*	4,4±0,5*	4,2±0,3*
Содержание перекиси водорода, мкг/л	38,5±6,2	41,0±5,5	43,0±4,3	36,9±4,0
Активность МПО, мккат/л	70,9±6,4	53,1±3,2*	53,3±3,5*	51,8±3,9*
Активность каталазы, %	55,1±2,7	54,0±2,6	51,3±2,2	50,1±2,2

Примечание: * — достоверность различий с контрольной группой, p<0,05.

Таблица 2

Показатели кислородного метаболизма нейтрофильных гранулоцитов в зависимости от исходного уровня активности супероксиданиона у больных с различными проявлениями ишемической болезни сердца

Показатели	Контрольная группа (n=20)	1 группа (n=33)		2 группа (n=29)	
		1 сутки	7 суток	1 сутки	7 суток
Активность СОА, ммоль/л	6,3±0,6	1,5±0,18*	3,5±0,4*	6,7±0,3	5,6±0,4
Содержание перекиси водорода, мкг/л	38,5±6,2	18,3±2,6*	21,3±3,7*	49,8±3,8	41,2±3,0
Активность МПО, мккат/л	70,9±6,4	47,1±4,9*	43,1±5,0*	60,4±4,8	60,0±6,8
Активность каталазы, %	55,1±2,7	49,4±3,6*	44,2±3,9*	53,4±3,1	54,8±2,5

Примечание: * — достоверность различий с контрольной группой, p<0,05.

Течение острого коронарного синдрома на протяжении госпитального периода

Признак	1 группа (n=33)	2 группа (n=29)	P
Фибрилляция желудочков/желудочковая тахикардия, 1 сутки	8 (24,2%)	0	p<0,05
Острая левожелудочковая недостаточность, 1 сутки	11 (32,3%)	7 (25,0%)	p>0,05
Острая левожелудочковая недостаточность, 3 сутки	6 (17,6%)	2 (6,2%)	p>0,05
Атриовентрикулярная блокада, блокада ножки пучка Гиса, фибрилляция предсердий, 1 сутки	9 (27,3%)	0	p<0,1

и прогноза ОКС описано раньше [7]. В частности, Н. V. Barron указывает, что у больных с большим количеством НГ снижается эпикардальный ток крови (epicardial blood flow), перфузия миокарда (myocardial perfusion), тромбоустойчивость (tromboresistance), повышается сердечная недостаточность (new congestive heart failure) и смертность. Вполне возможно, что такой выброс воспалительных клеток направлен на количественную компенсацию качественной недостаточности фагоцитов. Воспалительный процесс, лежащий в основе атеросклероза, в частности, по данным литературы, возможно обусловленный инфекцией и продукты воспаления, образовавшиеся в ходе этого процесса являются активным раздражителем костного мозга. В связи с этим в периферической крови появляются незрелые формы НГ, функциональная активность которых по сравнению со зрелыми клетками значительно снижена [4]. С другой стороны, ослабление цитотоксического потенциала может служить одним из ранних признаков “функциональной усталости” клеток, которая следует за любой стимуляцией НГ. Чрезмерные функциональные перегрузки истощают резервные возможности НГ [4,6].

Выявление в венозной крови функционально “неполноценных” НГ может быть также следствием того, что активные НГ реализуют свои способности только в очаге воспаления, погибая и там же поглощаясь макрофагами, не возвращаясь в кровоток. Есть работы, указывающие на различия активности НГ и других факторов воспаления в коронарном синусе, артериальной и венозной крови [7].

Анализ госпитального периода показал, что пациенты 1 группы имели большую частоту осложнений на протяжении первых 7 суток ОКС. У них достоверно чаще развивались желудочковая тахикардия/фибрилляция желудочков, пароксиз-

мы фибрилляции предсердия, блокады ножек пучка Гиса как в 1 сутки заболевания, так и на протяжении всего госпитального периода (табл. 3). Следует также отметить особенности глобального показателя функции почек — скорости клубочковой фильтрации. Так у больных 1 группы этот показатель в динамике на 10 сут увеличивался только на 5,1% (с 77,68 до 81,87 мл/мин), тогда как у больных 2 группы — на 20,3% (с 73,8 до 89,2 мл/мин, p<0,05).

Таким образом, наши исследования показали, что снижение кислородного метаболизма НГ ассоциируется, во-первых, с их высоким абсолютным содержанием в периферической крови, что является неблагоприятным признаком течения болезни. НГ, исполняя начальную защитную роль, как клетки врожденного иммунитета, способны причинить вред, вызывая дополнительную альтерацию той ткани, которую они инфильтрируют [7,9]. Такой механизм может быть ответственным за известные клинические феномены “не возобновленного тканевого кровотока” после тромболитической терапии или ангиопластики-стентирования в результате микрососудистой обструкции (известного как феномен no-reflow в англоязычной литературе), последующего увеличения зоны некроза и процесса ранней дилатации полости сердца. Ряд исследователей считает, что микрососудистые и миокардиальные повреждения при ОКС являются результатом неконтролируемого иммунного ответа, ассоциированного с нейтрофилией [8].

Во-вторых, клеточная несостоятельность, также как и высокий нейтрофилёз ассоциируется с осложненным течением ОКС.

Поэтому изучение кислородного метаболизма НГ является важным для характеристики патологического процесса и развития возможных осложнений.

1. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько, Б.М. Мрикаев, С.В. Уханов // Труды ИСА РАН. — 2006. — Т. 19. — С. 50–69.
2. Гавриленко Т.І., Рижкова Н.О. Спосіб визначення перекису водню у нейтрофільних гранулоцитах // Промислова власність. — 2012. — № 21. — Патент № 74942.
3. Кузьменко Д.И., Жаворонок Т.В., Мамонтова И.П., Андрушкевич В.В., Тырышкин А.М. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учебное пособие / Под ред. В.Ю. Сереброва, Г.А. Сухановой. — Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2008. — 180 с.
4. Пинегин Б.В., Маянский А.Н. Нейтрофилы: структура и функции // Иммунология. — 2007. — № 6. — С. 374–382.
5. Рижкова Н.А. Особенности функционального состояния иммунокомпетентных клеток при остром коронарном синдроме // Иммунология и аллергология. — 2006. — № 4. — С. 21–25.
6. Alyasin S., Amin R. Intracellular myeloperoxidase in myocardial infarction // Shiraz E-Med. J. — 2005. — Vol. 6. — P. 23–31.
7. Barron H.V., Cannon C.P., Murphy S.A. et al. Association between white blood cell count, epicardial blood flow myocardial perfusion and clinical outcomes in the setting of acute myocardial infarction // Circulation. — 2000. — Vol. 102. — P. 2329–2334.
8. Bodi V., Sanchis J, Nunez J. et al. Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: Unraveling the thread // Am. Heart J. — 2008. — Vol. 156. — P. 1065–1073.
9. Cascao R., Rosario H.S., Fonseca J.E. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases // Acta reumatol. Port. — 2009. — Vol. 34. — P. 313–326.

КИСНЕВИЙ МЕТАБОЛІЗМ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ У ХВОРИХ З РІЗНИМИ ПРОЯВАМИ ІШЕМІЧНОЇ ХВОРОБИ СЕРЦЯ

Н.О. Рижкова

У роботі показані особливості кисневого метаболізму нейтрофільних гранулоцитів (активність супероксиданіону, мієлопероксидази, каталази і вміст перекису водню) у хворих з ішемічною хворобою серця. Хворі 1 групи характеризувалися низькою активністю кисневого метаболізму клітин, що асоціювалося з їх високим абсолютним вмістом в периферичній крові і ускладненим перебігом захворювання. У хворих 2 групи спостерігалася нормальна активність кисневого метаболізму клітин і сприятливий перебіг хвороби.

OXYGEN METABOLISM OF NEUTROPHILES AT PATIENTS WITH THE DIFFERENT DISPLAYS OF ISCHEMIC HEART DISEASE

N.A. Ryzhkova

The features of oxygen metabolism of neutrophiles (activity of superoxidanion, myeloperoxidases, catalases and hydrogen peroxid) are in-process rotined at patients with ischemic heart disease. The patients of a 1 group were characterized low activity of oxygen metabolism of cells, that was associated with their high absolute maintenance in peripheral blood and complicated flow of disease. At patients 2 groups the normal activity of oxygen metabolism of cells was marked and favourable flow of disease.

Л.В. Якушко

УРОВЕНЬ СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

ГУ ННЦ “Институт кардиологии имени акад. Н.Д. Стражеско” НАМН Украины, отдел иммунологии, г. Киев

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются фагоцитирующими клетками, поддерживающие гомеостаз и составляющие первую линию противомикробной защиты. При остром воспалительном процессе НГ работают как эффекторы и могут нейтрализовывать и элиминировать большое количество патогенов. Эти клетки одними из первых вовлекаются в воспалительный процесс и играют ведущую роль в запуске механизмов развития воспаления [5].

Кроме этого, НГ в настоящее время рассматриваются как продуценты широкого спектра цитокинов, оказывая активное влияние на другие клетки (лимфоциты, моноциты, тромбоциты и др.) крови, а также клетки эндотелия и соединительной ткани, регулируя направленность иммунного ответа [8].

На сегодняшний день для определения секреторной способности НГ используют сыворотку или плазму крови, что в целом отражает текущее состояние работы иммунокомпетентных и других клеток организма, т.е. синтез цитокинов клетками *in vivo*. Одним из недостатков такого определения является короткий период жизни цитокинов в циркулирующей крови, а также их способность активно связываться в комплексы с различными сывороточными белками. Исходя из этого многие исследователи предпочитают измерять уровень цитокинов не в сыворотке, а в супернатантах иммунокомпетентных клеток, культивируя их как без, так и с различными специфическими и неспецифическими митогенами. На наш взгляд, определение синтеза цитокинов в культуре клеток позволяет определить функциональное состояние изучаемых клеток. При этом спонтанная продукция клеток в супернатанте свидетельствует о том, что клетки уже активированы *in vivo*. А стимуляция НГ *in vitro* различными индукторами дает возможность оценить потенциальные возможности активации клеток и их резервные возможности [2, 3].