

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 І 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 нейтрализовать 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].

В последние годы усилилось внимание к изучению цитокинсинтезирующей способности НГ [10]. Особый интерес представляет определение секретируемых нейтрофилами цитокинов в супернатантах. Этот метод может быть легко стандартизован, т.к. при его проведении используются стандартные реагенты, среды культивирования, а также количество клеток в культуре. Однако на сегодняшний день эта область иммунологии остается изученной недостаточно, особенно у больных с сердечно-сосудистой патологией.

Известно, что НГ очень чувствительны к различным стимулирующим воздействиям и быстро мигрируют в очаг воспаления. НГ хорошо переносят гипоксию и осуществляют многие свои физиологические функции в условиях гипоксии. При инфаркте миокарда НГ уже к концу первых суток накапливаются по периферии некроза, затем мигрируют к его центру. Их число увеличивается в 10–15 раз [4]. Секретируемые НГ различные медиаторы воспаления, в том числе цитокины, существенно влияют на стабильность атеросклеротических бляшек, способствуют их разрыву с возникновением острых коронарных синдромов.

Целью работы была оценка спонтанной продукции фактора некроза опухолей- $\alpha$  ФНО- $\alpha$  и интерлейкина-10 (ИЛ-10) в супернатантах НГ у больных ишемической болезнью сердца.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего обследовано 76 больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Из них 34 пациента со стабильной стенокардией (СС) и 42 — с острым инфарктом миокарда (ОИМ). Больные с ОИМ обследовались в первые часы поступления и на 10 сутки пребывания в стационаре. Все обследованные были разделены на 3 группы: 1 группу составили пациенты с СС, 2 — с ОИМ в первые сутки поступления в стационар, и 3 — с ОИМ на 10 сутки. В группу контроля вошло 20 практически здоровых лиц.

Забор крови и постановку метода осуществляли в стерильном боксе. Клетки выделяли из гепаринизированной (25 МЕ/мл) венозной крови. НГ получали путем центрифугирования на двойном градиенте плотности фиколла-верографина (1,076 и 1,120 г/см<sup>3</sup>). Полученную клеточную взвесь НГ дважды отмывали средой 199 и доводили до концентрации  $1 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл. Для культивирования готовили полную питательную среду, состоящую из среды 199, 10-ти % эмбриональной телячьей сыворотки и раствора гентамицина (80 мкг/мл). Инкубацию

осуществляли при 37°C 24 часа. После инкубации супернатанты НГ отбирали, центрифугировали и хранили при –20°C.

Методом иммуноферментного анализа определяли содержание провоспалительного ФНО- $\alpha$  с использованием стандартных тест-систем (“Pro Con”, Россия) и противовоспалительного интерлейкина ИЛ-10 (“Biosource” Invitrogen Corporation, Канада) согласно инструкции производителя.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий показателей в группах определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что у всех обследованных пациентов содержание ФНО- $\alpha$  в супернатантах НГ практически не отличались от показателей контрольной группы (табл. 1). У больных со СС наблюдалась тенденция к повышению уровня ФНО- $\alpha$ , однако достоверных отличий не отмечалось. У пациентов с ОИМ ФНО- $\alpha$  также был в пределах нормы как во время поступления, так и на 10 сутки пребывания в стационаре.

Другая картина наблюдалась у обследованных больных относительно секреции противовоспалительного ИЛ-10, который контролирует действие провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8 и др.), подавляет их избыточную продукцию и угнетает синтез цитокинов нейтрофильными гранулоцитами и натуральными киллерными клетками [15].

Экспрессия ИЛ-10 идентифицирована на ранних стадиях атерогенеза и играет существенную роль в возникновении, прогрессировании и стабилизации атеросклеротической бляшки, в которой ИЛ-10 способен ограничивать локальные воспалительные процессы [14].

На экспериментальной модели инфаркта миокарда у животных получены прямые доказательства того, что ИЛ-10 образуется в миокарде во время ишемии и реперфузии. Значительное усиление экспрессии ИЛ-10 именно во время восстановления кровообращения в миокарде выполняет защитную роль вследствие угнетения острого воспалительного процесса и обусловлено, скорее всего, реперфузией стимулирования цитокинов, которые способствуют секреции ИЛ-10 [1, 11, 12].

Как видно из табл. 1 отмечается высокая цитокинпродуцирующая способность НГ в супернатантах по ИЛ-10 во всех обследуемых группах.

Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в супернатантах нейтрофильных гранулоцитов (1. 106/мл) у обследованных пациентов (M±m)

Показатель	Контрольная группа (n=20)	Больные со стабильной стенокардией – 1 гр. (n=34)	Больные с острым инфарктом миокарда (n=42)	
			1 сутки – 2 гр.	10 сутки – 3 гр.
ФНО-α, пг/мл	50,5±10,1	75,7±11,2	57,1±7,7	57,1±9,1
ИЛ-10, пг/мл	1,9±0,5	56,9±13,3 *	9,9±1,9*●	101,9±30,8 *◆

Примечание: \* – достоверность отличий с контрольной группой, p<0,05; ● – достоверность отличий между 1 и 2 группами, p<0,05; ◆ – достоверность отличий между 2 и 3 группами, p<0,05.

У больных ОИМ в 1 сутки наблюдения имело место умеренное повышение уровня противовоспалительного ИЛ-10, который значительно возрос к 10 суткам и превышал показатель контрольной группы в 51 раз. Отмечены достоверные отличия уровня ИЛ-10 относительно пациентов ОИМ в первые сутки пребывания в стационаре, а также относительно пациентов с СС.

Как показали наши исследования, относительные величины не всегда точно отображают функциональную активность каждой клетки. При пересчете клеток в абсолютные значения получена более яркая картина показателей функционального состояния НГ в цельной популяции.

Установлено, что у больных со СС абсолютное количество НГ практически не изменялось, в то время как у пациентов ОИМ имело место отличие по группам. Увеличение количества клеток происходило в зависимости от нарастания тяжести патологического процесса (табл. 2). Так, у больных ОИМ в 1 сутки наблюдалось превышение абсолютных величин НГ в 3 раза по сравнению с контрольной группой и в 1,7 раза – с группой пациентов с ОИМ на 10 сутки (p<0,05). Отмечено снижение абсолютного числа НГ у больных ОИМ на 10 сутки пребывания в стационаре, однако этот показатель оставался все

еще достоверно высоким относительно группы практически здоровых лиц.

Проведенные ранее исследования показали, что незначительное повышение абсолютного количества НГ при ИБС (до  $5,0 \cdot 10^9$ /л) является адекватной реакцией организма на воспаление, которая направлена на поддержание гомеостаза. Накопление же НГ и выброс их большого количества является неблагоприятным фактором, который может не только поддерживать, но и усугублять патологический процесс, а также способствовать развитию осложнений заболевания [7].

Как следует из табл. 2, у больных ИБС выявлено повышение абсолютных величин ИЛ-10 в супернатантах НГ. При этом у пациентов с ОИМ установлены отличия в содержании ИЛ-10 в динамике наблюдения: высокий уровень ИЛ-10 в 1 сутки и дальнейшее повышение его продукции к 10 суткам. Кроме этого, в группе больных с ОИМ определялся достоверно высокий исходный уровень абсолютных значений ФНО-α. К 10 суткам продукция ФНО-α значительно снижалась и наблюдалась нормализация его содержания. ФНО-α отводится важное значение в формировании развития иммунновоспалительной реакции. Наряду с другими провоспалительными цитокинами ФНО-α стимулирует рост и диф-

Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в супернатантах нейтрофильных гранулоцитов у обследованных пациентов в пересчете на абсолютное количество клеток (M±m)

Показатели	Контрольная группа (n = 20)	Больные со стабильной стенокардией – 1 гр. (n=34)	Больные с острым инфарктом миокарда (n=42)	
			1 сутки – 2 гр.	10 сутки – 3 гр.
Нейтрофилы, $1 \cdot 10^9$ /л	3,1±0,1	3,8±0,1 *	9,1±0,3 *	5,4±0,2*■◆
ФНО-α, пг/мл	244,5±81,1	314,9±61,2	822,2±111,6*●	180,7±26,2◆
ИЛ-10, пг/мл	2,3±1,0	152,1±61,7*	77,9±15,6 *	327,7±99,0*◆

Примечание: \* – достоверность отличий с контрольной группой, p<0,05; ● – достоверность отличий между 1 и 2 группами, p<0,05; ■ – достоверность отличий между 1 и 3 группами, p<0,05; ◆ – достоверность отличий между 2 и 3 группами, p<0,05.



ференцировку нейтрофилов, эндотелиальных клеток, усиливает поступление НГ из костного мозга в кровь. ФНО- $\alpha$  реализует свое действие преимущественно локально в месте синтеза. В то же время опосредовано ФНО- $\alpha$  может вызывать и системные эффекты [6].

Также известно, что ФНО- $\alpha$  вовлечен в целый ряд процессов при прогрессировании атеросклероза, сердечной недостаточности. При этом клеточные элементы атеросклеротических бляшек начинают сами продуцировать провоспалительные цитокины, тем самым усугубляя атерогенез. ФНО- $\alpha$  может принимать участие в развитии и прогрессировании воспаления, микрососудистой гиперкоагуляции, дисфункции эндотелия, гемодинамических нарушений при различных заболеваниях сердца как инфекционного, так и неинфекционного происхождения [9, 13].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что определение уровней про- и противовоспалительных интерлейкинов в супернатантах является важной и надежной оценкой цитокинпродуцирующей способности НГ.

Так, у обследованных пациентов определялся разный цитокиновый профиль в супернатантах НГ как в момент поступления больного в стационар, так и к 10 суткам.

У пациентов с ОИМ очевидна активация функциональной способности НГ и усиление противовоспалительных эффектов за счет интенсивной продукции ИЛ-10, более выраженной на 10 сутки лечения. Также наблюдается увеличение абсолютного уровня ФНО- $\alpha$  в 1 сутки пребывания в стационаре, которое было связано с количеством абсолютного числа НГ. У больных же со СС отмечено умеренное повышение как провоспалительного ФНО- $\alpha$ , так и секретирующей способности НГ по ИЛ-10.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дем'янець С.В. Роль протизапального цитокіну інтерлейкіну-10 у патогенезі атеросклерозу // *Укр. кардіол. журнал.* — 2002. — № 6. — С. 100–105.
2. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // *Цитокины и воспаление.* — 2003. — Т. 2, № 3. — С. 20–35.
3. Комплексная оценка уровня спонтанной продукции цитокинов в культуре мононуклеарных клеток периферической крови здорового человека / В.И. Коненков, И.Г. Ракова, В.В. Авдошина, Е.Л. Гельфгат // *Цитокины и воспаление.* — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 33–37.
4. Маянский Д.Н., Маянская С.Д. Роль нейтрофилов в ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда // *Терапевт. архив.* — 2001. — № 12. — С. 84–88.
5. Пинегин Б.В., Маянский А.Н. Нейтрофилы: структура и функции // *Иммунология.* — 2007. — № 6. — С. 374–381.

6. Роль медиаторных механизмов в иммунопатогенезе воспаления при сердечно-сосудистых заболеваниях и остеопорозе / В.В. Цурко, И.В. Леоненко, И.В. Егоров, М.Я. Красносельский // *Терапевт. архив.* — 2009. — № 6. — С. 92–96.
7. Сравнительная характеристика функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов у больных с различными формами ишемической болезни сердца. Ч. II. Абсолютные величины / Н.А. Рыжкова, Т.И. Гавриленко, А.Н. Пархоменко, А.Н. Ломаковский, Г.В. Пономарева, Я.М. Лутай, Л.Н. Кравченко // *Укр. кардіол. журнал.* — 2006. — № 6. — С. 28–33.
8. Швыдченко И.Н. Нейтрофильные гранулоциты как источник цитокинов семейства интерлейкина-1 // *Цитокины и воспаление.* — 2012. — Т. 11, № 1. — С. 17–25.
9. Candia A.M., Villacorta H.Jr., Mesquita E.T. Immune-inflammatory activation in heart failure // *Arq. Bras. Cardiol.* — 2007. — Vol. 89, № 3. — P. 183–208.
10. Carsao 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.
11. Frangogiannis N.G., Mendoza L.M., Lindsey M.L. et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury // *J. Immunology.* — 2000. — Vol. 5. — P. 2798–2808.
12. Izumi T., Nishii M. Diagnostic and prognostic biomarkers in acute myocarditis. Interleukin-10 // *Herz.* — 2012. — Vol. 37, № 6. — P. 627–631.
13. Kleemann R., Zadelaar S., Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive of studies in mice // *Cardiovasc. Res.* — 2008. — № 5. — P. 1–5.
14. Potteaux S., Esposito B., van Oostron O. et al. Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24, № 8. — P. 1474–1478.
15. Zimmerman M.A., Reznikov L.L., Raeburn C.D. Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury // *J. Surg. Res.* — 2004. — Vol. 121, № 2. — P. 206–213.

#### РІВЕНЬ СЕКРЕТОРНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНУ ХВОРОБУ СЕРЦЯ

Л.В. Якушко

Визначали рівень фактора некрозу пухлин (ФНП)- $\alpha$  та інтерлейкіну (ІЛ)-10 в супернатантах нейтрофільних гранулоцитів (НГ) у пацієнтів на стабільну стенокардію (СС) та гострий інфаркт міокарду (ГІМ). Встановлено особливості функціонування НГ: помірна активація секреції ФНП- $\alpha$  та ІЛ-10 у хворих на СС та значне збільшення як відносного, так і абсолютного ІЛ-10 на 10 добу спостереження у хворих на ГІМ.

#### THE LEVEL OF SECRETORY ACTIVITY OF NEUTROCYTES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

L.V. Yakushko

The levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-10 in supernatants of neutrocytes (NC) in patients with a stable angina (CA) and acute myocardial infarction (AMI) were defined. Features of functioning NC it was determined: the moderate activation of secretion TNF- $\alpha$  and IL-10 with CC and substantial growth both relative, and both absolute values IL-10 by 10-day of observation in patients with AMI.