

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ, УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ У БОЛЬНЫХ СО СМЕРТЕЛЬНЫМ ИСХОДОМ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

УДК 616.12—005.41:616—008.9—312.2

Поступила 2.12.2009 г.



А.Е. Кратнов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапии педиатрического факультета;
Е.С. Углов, к.м.н., доцент кафедры терапии педиатрического факультета;
А.А. Кратнов, аспирант кафедры терапии педиатрического факультета

Государственная медицинская академия, Ярославль

Цель исследования — изучение у больных с ИБС метаболической активности нейтрофилов, уровня провоспалительных цитокинов и эндотелиальной дисфункции в качестве маркеров кардиальной смерти.

Материалы и методы. У 100 больных с нестабильной стенокардией и инфарктом миокарда изучалась метаболическая активность нейтрофилов, определялось содержание интерлейкина-6, фактора некроза опухоли α , фактора фон Виллебранда.

Результаты. Установлено, что у больных с наступившей в течение года наблюдения кардиальной смертью при поступлении в стационар выявлялись более высокие уровни интерлейкина-6 и фактора фон Виллебранда, а также нейтрофилия, которая сопровождалась увеличением производства фагоцитами активных форм кислорода на фоне снижения их антиоксидантной защиты (глутатионредуктазы) и активации процесса перекисного окисления липидов. Обнаружена сильно выраженная прямая корреляция ($r=0,90$; $p=0,03$) между ростом концентрации фактора фон Виллебранда и увеличением выработки нейтрофилами активных форм кислорода.

Ключевые слова: нейтрофилы, продукция активных форм кислорода, цитокины, эндотелиальная дисфункция, кардиальная смерть.

English

Metabolic activity of neutrophils, a level of pro-inflammatory cytokines and endothelial dysfunction in patients with the ischemic heart disease lethal outcome

A.E. Kratnov, M.D., professor, head of a pediatric faculty therapy chair;
E.S. Uglov, c.m.s., assistant professor of a pediatric faculty therapy chair;
A.A. Kratnov, post-graduate of a pediatric faculty therapy chair

State medical academy, Yaroslavl

Aim of investigation is a study of the neutrophil metabolic activity, a level of pro-inflammatory cytokines and endothelial dysfunction in patients with IHD as the cardiac death markers.

Materials and methods. A metabolic activity of neutrophils was studied in 100 patients with instable stenocardia and myocardial infarction; a content of interleukin-6, the tumor necrosis factor α , the von Villebrand's factor was detected.

Results. It is established, that the higher levels of interleukin-6 and the von Villebrand's factor as well as neutrophilia, accompanied by the oxygen active form phagocyte production increase at the background of their antioxidant protection decrease (glutathionreductase) and activation of the lipid peroxidation process, have been revealed in patients with a cardiac death at a hospital during a year. A strongly expressed direct correlation ($r=0.90$; $p=0.03$) between the von Villebrand's factor concentration growth and an increase of the oxygen active form output by neutrophiles is found.

Key words: neutrophils, production of the oxygen active forms, cytokines, endothelial dysfunction, cardiac death.

Для контактов: Кратнов Андрей Евгеньевич, тел. раб. 8(4852)79-29-05; e-mail: kratnov@mail.ru.

Несмотря на определенные достижения в лечении ишемической болезни сердца (ИБС), она по-прежнему остается главной причиной смерти [1]. В последние годы среди прогностических маркеров риска кардиальной смерти привлекает внимание увеличение в периферической крови количества нейтрофилов, которым принадлежит основная роль в реперфузионном повреждении миокарда [2, 3]. Показано, что развитие при ИБС эндотелиальной дисфункции также связано с повышенным риском кардиальной смерти [4]. Основные механизмы, лежащие в основе повышенного сердечно-сосудистого риска при эндотелиальной дисфункции у больных ИБС, изучены недостаточно. Полагают, что важная роль в развитии дисфункции эндотелия при ИБС принадлежит реактивным формам кислорода, образуемым нейтрофилами при реперфузии миокарда [5]. Известно, что основным источником активных радикалов кислорода является фермент НАДФ-оксидаза, в регуляции которого участвуют цитокины и гормоны [6].

Цель исследования — изучение у больных со смертельным исходом ИБС метаболической активности нейтрофилов, содержания в крови интерлейкина-6, фактора некроза опухоли α и фактора фон Виллебранда, увеличение концентрации которого отражает генерализованную эндотелиальную дисфункцию [7].

Материалы и методы. Обследовано 100 пациентов с ИБС (средний возраст $63,7 \pm 9,4$ года), среди которых 54 больных нестабильной стенокардией и 46 — инфарктом миокарда (11 — без зубца Q и 35 — с зубцом Q). Количество мужчин и женщин среди обследованных больных достоверно не различалось — 53 и 47. Сахарный диабет 2-го типа был диагностирован у 46 больных: у 27 (58,7%) — с нестабильной стенокардией и у 19 (41,3%) — с инфарктом миокарда. Наблюдение за больными продолжалось 12 мес с момента включения в исследование. За это время умерли от сердечно-сосудистых причин 7 больных. Контрольную группу из 17 доноров без клинически и инструментально подтвержденной ИБС и сахарного диабета составили 10 мужчин (58,8%) и 7 женщин (41,2%) (средний возраст $54,7 \pm 4,1$ года).

В качестве исследуемого материала использовалась периферическая кровь, анализ которой осуществляли при поступлении пациентов в блок интенсивной терапии кардиологического отделения стационара. Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фиколла-верографина — 1,077 и 1,092 г/мл. В качестве индукторов кислородзависимого метаболизма фагоцитов использовали: взвесь $1 \cdot 10^9$ убитых клеток *Staphylococcus aureus* штамма p-209 (активность Fc-рецепторов) и фитогемагглютинин (активность C3-рецепторов) из бобов фасоли (*Phaseolus vulgaris*). С целью изучения активности НАДФ-оксидазы нейтрофилов использовался спонтанный и стимулированный тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), который проводили количественным спектрофотометрическим методом по Т.А. Gentle и R.A. Thompson (1990) с использованием 0,2% раствора НСТ и растворением восстановленного диформаза в смеси 2М калия гидроксида и диметилсульфоксида 3:5 по объему

[8]. Активность миелопероксидазы в лизате фагоцитов оценивали количественным спектрофотометрическим методом с использованием 0,04% раствора орто-фенилендиамина на фосфатном буфере с рН, равной 5,0, и добавлением 0,33% раствора перекиси водорода в соотношении 20:1 по объему [9]. Активность глутатионредуктазы в лизате нейтрофилов определяли спектрофотометрическим методом по степени окисления НАДФ-Н [10]. Конечный результат восстановления НСТ, содержания миелопероксидазы и активности глутатионредуктазы рассчитывали на $1 \cdot 10^6$ фагоцитов, исходя из содержания в исследуемой суспензии $5 \cdot 10^6$ клеток. Уровень малонового диальдегида в сыворотке крови определяли непрямой метод, основанным на его способности взаимодействовать с тиобарбитуровой кислотой при высокой температуре и низкой рН с образованием окрашенного комплекса [11]. Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли по методу А. Digean и В. Mayer в модификации В. Гашковой и соавт. (1978), преципитацией в растворе полиэтиленгликоля при рН, равной 8,4 [12]. Определение концентрации фактора фон Виллебранда в сыворотке крови проводилось с помощью твердофазного иммуноферментного метода с использованием коммерческих реактивов ф. DAKO (Дания) и международных стандартов (NIBSC, Англия). Уровни интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли α определялись в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов ProCon IL-6 и TNF- α ООО «Протеиновый контур» (С.-Петербург, Россия). Концентрацию С-реактивного белка определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа по J. Highton и P. Hessian [13].

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета программ Statistica 5.5. Для сравнения средних непрерывных величин с нормальным распределением применялся групповой *t*-тест, с неправильным распределением — непараметрический критерий Манна—Уитни. Данные исследований представлены в виде их средних значений и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. У больных ИБС с наступившей в течение года наблюдения кардиальной смертью в отличие от пациентов, оставшихся живыми, при поступлении в стационар наблюдалось достоверно большее количество лейкоцитов — $(9,8 \pm 4,6) \cdot 10^9/\text{л}$ и $(8,3 \pm 3) \cdot 10^9/\text{л}$; $p = 0,007$, нейтрофилов — $68,5 \pm 13,7$ и $65,1 \pm 12,3\%$; $p = 0,02$ и ниже — лимфоцитов — $21,9 \pm 11,8$ и $25,8 \pm 10,7\%$; $p = 0,01$ в периферической крови. По уровню глюкозы капиллярной крови при поступлении в стационар умершие и оставшиеся в живых больные не различались (см. таблицу). У умерших больных при поступлении в стационар были статистически значимо ниже уровни триглицеридов ($p = 0,03$) и холестерина ($p = 0,00007$).

При изучении показателей метаболической активности нейтрофилов выявлено, что у больных ИБС, умерших в течение года, при поступлении в стационар выявлялись статистически значимо более высокие показатели спонтанного ($p = 0,006$) и стимулированно-

Иммунологические и биохимические показатели у обследованных больных ИБС

Показатель	Контроль (n=17)	Остались живы (n=91)	Кардиальная смерть (n=7)
Спонтанный НСТ, нмоль восст. НСТ	105,7±16,8	101,5±24,3	118,2±10,2* +
Ст. НСТ (FcR), нмоль восст. НСТ	117,3±19,5	111,4±27,7	136,1±34,4*
Ст. НСТ (C3R), нмоль восст. НСТ	109,2±10,7	116,2±27,9	160,8±41,9* +
Глутатионредуктаза, нмоль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	81±107,4	40,9±39,8*	15±11,2* +
Миелопероксидаза, усл. ед.	21±11,3	15,4±8,7	18,9±8,9
С-реактивный белок, мг/л	5,8 ± 3,1	32,5±42,3	60,4±60,7*
Интерлейкин-6, пг/мл	7,6±1,5	44,7±45,9*	90,6±55,6* +
Фактор некроза опухоли α, пг/мл	32,3±4,5	50,9±93	23,3±32,2
Фактор фон Виллебранда, МЕ/мл	1,0±0,1	2,7±1,1	3,8±1,7* +
ЦИК, ед. опт. пл.	46,9±29,8	72,9±67,6	68,5±55,2
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	39±5,7	62,9±20,1*	86,7±25* +
Глюкоза, ммоль/л	4,5±0,5	6±2,7	6,2±3,7
Холестерин, мг/дл	269,5±38,5	258,1±76	214,1±59,8* +
Триглицериды, мг/дл	157,5±21,3	226,5±135,9	152,6±103,5 +

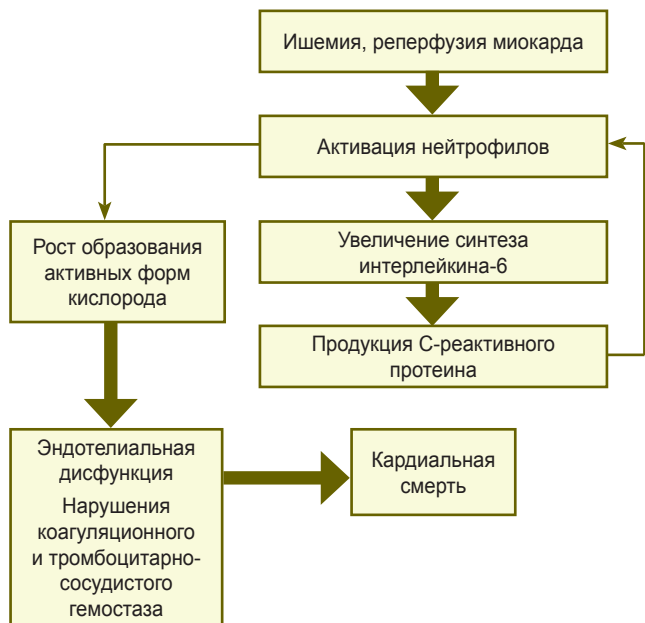
Примечание (p<0,05): * — по сравнению с контролем, + — между группами больных. Ст. — стимулированный, восст. — восстановленный.

го НСТ, как через Fc- (p=0,01), так и через C3-рецепторы (p=0,003). Увеличение продукции супероксидного анион-радикала у данных пациентов сопровождалось достоверным значительным снижением активности глутатионредуктазы (p=0,04). Также при поступлении в стационар у пациентов с наступившей кардиальной смертью были статистически значимо более высокие уровни интерлейкина-6 (p=0,04) и фактора фон Виллебранда (p=0,04). Концентрация С-реактивного белка была достоверно выше контрольных значений (p=0,01). Выявленный рост продукции нейтрофилов активных форм кислорода сопровождался достоверным увеличением содержания в крови вторичных продуктов перекисного окисления липидов — малонового диальдегида (p=0,003). Таким образом, у больных ИБС, умерших в течение года от сердечно-сосудистых причин, при поступлении в стационар наблюдался рост уровня интерлейкина-6, генерализованная эндотелиальная дисфункция, а также нейтрофилия, которая сопровождалась увеличением производства фагоцитами активных форм кислорода на фоне снижения их антиоксидантной защиты и активации процесса перекисного окисления липидов.

На сегодняшний день считается доказанным, что при воздействии различных повреждающих факторов (острая гипоксия, воспаление, интоксикация и т.д.) наблюдается извращение компенсаторной «дилатирующей» способности эндотелия и преимущественным ответом эндотелиальных клеток даже на обычные стимулы становятся вазоконстрикция и пролиферация [14]. Процесс повреждения или гибели эндотелиальных клеток сопровождается усилением синтеза и высвобождением из телец Weibel—Palade мультимерного гликопротеина — фактора фон Виллебранда [15]. Выявлена связь между повышением уровня фактора фон Виллебранда

и смертностью от сердечно-сосудистых причин [16]. Недавно получены данные, что повышенное образование активных форм кислорода при ИБС сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции [17]. В то же время обращается внимание на связь нейтрофилии с повышенным риском кардиальной смерти [2]. По данным В.К. Duffy и соавт. [18], увеличение отношения количества нейтрофилов к лимфоцитам является независимым маркером риска смерти у пациентов с ИБС, которые подверглись коронарной ангиографии. В данном исследовании у больных ИБС с наступившей впоследствии кардиальной смертью по сравнению с выжившими пациентами также выявлено увеличение соотношения «нейтрофилы/лимфоциты» (3,1 и 2,5), между которыми наблюдалась обратная корреляция (r=-0,89; p=0,006). При этом обнаружена повышенная продукция нейтрофилами супероксидного анион-радикала на фоне депрессии антиоксидантной защиты клеток. Наличие у больных с наступившей кардиальной смертью сильно выраженной прямой корреляции между уровнем фактора фон Виллебранда и НСТ (r=0,90; p=0,03) свидетельствует о связи генерализованной эндотелиальной дисфункции с увеличением выработки нейтрофилами активных форм кислорода.

Известно, что синтез С-реактивного белка в печени регулируется преимущественно цитокинами, особенно интерлейкином-6, который секретируется активированными нейтрофилами и эндотелиальными клетками [19]. В свою очередь показано, что у больных с атеротромбозом С-реактивный белок стимулирует образование фагоцитами свободных радикалов и провоспалительных цитокинов, в том числе и интерлейкина-6 [20]. С-реактивный белок также приводит к увеличению трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. Следовательно, активация нейтрофилов, возникающая при реперфузии



Возможная связь активации нейтрофилов и эндотелиальной дисфункции у больных с наступившей кардиальной смертью

ишемизированного миокарда, может приводить к росту секреции интерлейкина-6 клетками и последующего синтеза С-реактивного белка в печени с замыканием порочного круга (см. рисунок). В итоге активированные нейтрофилы синтезируют избыточное количество свободных радикалов кислорода, повреждающих эндотелиальные клетки, которые секретируют фактор фон Виллебранда, играющий ключевую роль в адгезии тромбоцитов, образовании тромба и гиперкоагуляции у больных с кардиальной смертью [21].

Известно, что между провоспалительными цитокинами — интерлейкином-6 и фактором некроза опухоли α — существуют сложные взаимно регулирующие эффекты, в частности первый угнетает продукцию второго. В данном исследовании у больных с кардиальной смертью рост интерлейкина-6 сопровождался снижением фактора некроза опухоли α [22].

На сегодняшний день к числу корригируемых факторов, увеличивающих риск кардиальной смерти, относятся повышенная частота сердечных сокращений, сниженная фракция выброса левого желудочка, дисфункция вегетативной нервной системы, желудочковые экстрасистолы, желудочковая тахикардия [1]. При повышении симпатической и снижении вагусной активности, что сопровождается увеличением частоты сердечных сокращений, может снижаться порог фибрилляции желудочков [23]. В недавно проведенном исследовании установлено, что у здоровых людей среднего возраста повышение уровня С-реактивного белка и количества лейкоцитов в периферической крови сопряжено с увеличением частоты сердечных сокращений [24]. В данном исследовании у больных с наступившей кардиальной смертью при поступлении в стационар была выше частота сердечных сокращений (интервал R—R равнялся $0,95 \pm 0,17$ и $0,85 \pm 0,11$ с;

$p=0,06$) и достоверно ниже фракция выброса левого желудочка ($40 \pm 0,9$ и $52,6 \pm 10,8\%$; $p=0,04$). Увеличение частоты сердечных сокращений у данных пациентов может быть связано с активацией симпатической нервной системы (сердечная недостаточность, курение), что приводит к увеличению количества циркулирующих нейтрофилов за счет перехода в циркуляцию части пристеночных клеток маргинального пула [25].

Более низкий уровень холестерина у больных с наступившей кардиальной смертью совпадает с данными других исследований, где выявлено его уменьшение на фоне роста уровня провоспалительных цитокинов [26, 27]. В условиях повышенного образования нейтрофилами кислородных радикалов на фоне снижения активности антиоксидантной защиты наблюдается активация процессов перекисного окисления липидов, что приводит к изменению структуры фосфолипидов и белков клеточной мембраны. В этих условиях липопротеины могут использоваться на восстановление данной структуры. Это подтверждает наличие обратной сильно выраженной корреляции ($r=-0,90$; $p=0,0008$) между спонтанным НСТ и уровнем холестерина.

Заключение. Наступление смертельного исхода при ИБС ассоциируется с ростом содержания в крови интерлейкина-6 и фактора фон Виллебранда, что сопровождается увеличением производства нейтрофилами активных форм кислорода на фоне снижения их антиоксидантной защиты.

Литература

1. *Мазур Н.А.* Внезапная кардиальная смерть. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2003; 2: 90—93.
2. *Kyne L., Hausdorff J.M., Dukas L. et al.* Neutrophilia and congestive heart failure after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2000; 139: 94—100.
3. *Sato H., Jordan J.E., Zhao Z.Q. et al.* Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1099—1107.
4. *Schachinger V., Britten M.B., Zeiher A.M.* Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary artery disease. *Circulation* 2000; 101: 1899—1906.
5. *Lucchesi B.R.* Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 420—432.
6. *Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M.* NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494—501.
7. *Lip G.Y., Blann A.* A von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res* 1997; 34: 255—265.
8. *Gentle T.A., Thompson R.A.* Neutrophil function tests in clinical immunology. In: H.G. Gooi, H. Chapel, editors. *Clinical Immunology. A practical approach*. New York: Oxford University Press; 1990; P. 57—59.
9. *Саидов М.З., Пинегин Б.В.* Спектрофотометрический способ определения активности миелопероксидазы в

- фагоцитирующих клетках. Лабораторное дело 1991; 3: 56—59.
10. Кратнов А.Е., Потапов П.П., Власова А.В. и др. Активность глутатионредуктазы в нейтрофилах у больных муковисцидозом. Клиническая лабораторная диагностика 2005; 2: 33—37.
 11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб: ИКФ Фолиант; 2000; 100 с.
 12. Гашкова В., Матл И., Кашлик И. Циркулирующие комплексы у больных иммунокомплексными заболеваниями и после трансплантации почек. Чех Мед 1978; 2: 117—122.
 13. Highton J., Hessian P. A solid-phase enzyme immunoassay for C-reactive protein: clinical value and the effect of rheumatoid factor. J Immunol Method 1984; 68: 185—192.
 14. Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю., Агеев Ф.Т. Эндотелиальная дисфункция при сердечной недостаточности: возможности терапии ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента. Кардиология 2001; 56: 100—104.
 15. Mannucci P.M. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1359—1362.
 16. Jansson J.H., Nilsson T.K., Johnson O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. Br Heart J 1991; 66: 351—355.
 17. Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K. et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation 2001; 104: 2673—2678.
 18. Duffy B.K., Gum H.S., Rajagopal V. et al. Usefulness of an elevated neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality after percutaneous coronary intervention. Am J Cardiol 2006; 97: 993—996.
 19. Zouki C., Beauchamp M., Baron C., Filep J.G. Prevention in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. J Clin Invest 1997; 100: 522—529.
 20. Jialal I., Devaraj S., Venugopal S.K. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? Hypertension 2004; 44: 6—11.
 21. Juhan-Vague I., Pyke S.D.M., Alessi M.C. et al. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. Circulation 1996; 94: 2057—2063.
 22. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. Т. I—II. СПб: Наука; 2000; 231 с.
 23. Heidland U.E., Stauer B.E. Left ventricular muscle mass and elevated heart rate are associated with coronary plaque disruption. Circulation 2001; 104: 1477—1482.
 24. Sajadieh A., Nielsen O.W., Rasmussen V. et al. Increased heart rate and reduced heart-rate variability are associated with subclinical inflammation in middle-aged and elderly subjects with no apparent heart disease. Eur Heart J 2004; 25: 363—370.
 25. Серов В.В., Пауков В.С. Воспаление. М: Медицина; 1995; 639 с.
 26. Rauchhaus M., Koloczek V., Volk H.-D. et al. Inflammatory cytokines and the possible immunological role for lipoproteins in chronic heart failure. Intern J of Cardiol 2000; 76: 125—133.
 27. Vredevoe D.L., Woo M.A., Doering L.V. et al. Skin test anergy in advanced heart failure secondary to either ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1998; 82: 323—328.