DOI: 10.33667/2078–5631–2019–3–22(397)-62–67

Функциональная способность нейтрофилов у больных ишемической болезнью сердца

В. Ю. Мишланов, д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней № 1
В. Е. Владимирский, д.м.н., доцент, зав. кафедрой факультетской терапии № 1 с курсом физиотерапии ФДПО
А. В. Туев, д.м.н., проф., заслуженный деятель науки России, проф. кафедры госпитальной терапии № 1

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь

Functional ability of neutrophils in patients with ischemic heart disease

V. Yu. Mishlanov, V. E. Vladimirsky, A. V. Tuev
Perm State Medical University n.a. E. A. Wagner, Perm, Russia

Резюме
Цель. ***Изучение белокпродуцирующей и липидвысвобождающей способности нейтрофилов и ее клинической значимости у больных ИБС.*** *Материалы и методы.* ***Обследованы 25 пациентов с артериальной гипертензией без клинических и ультразвуковых манифестаций атеросклероза; 47 больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения, а также 19 больных первичной нестабильной стенокардией. Группа сравнения — 33 практически здоровых лица. В сыворотке крови посредством иммуноферментного анализа оценивалась концентрация С-реактивного белка (СРБ), липопротеина а (ЛПа), VII фактора свертывания крови (VIIф), дефензинов-альфа (1–3), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа). Из периферической крови в присутствии декстранов выделялись лейкоциты, представленные преимущественно нейтрофилами, которые в дальнейшем культивировались, в лейкоцитарных супернатантах оценивалось содержание СРБ, ЛПа, дефензинов-альфа (1–3), VIIф, а также липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВСЛ) по методике А. В. Туева и В. Ю. Мишланова. Проводились ангиографическое исследование, дуплексное сканировавние артерий и эхокардиография.*** *Результаты.* ***Установлено, что у больных на этапе доклинического атеросклеротического поражения способность лейкоцитов к образованию белково-липидных комплексов (БЛК), маркируемая величиной ЛВСЛ, практически не отличается от здоровых лиц, но уже на этой стадии атерогенеза выявлено увеличение их способности к продукции противомикробных пептидов — дефензинов-альфа (1–3). У больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения отмечено увеличение продукции лейкоцитами широкого спектра белков — дефензинов-альфа (1–3), VIIф, ЛПа и СРБ в сочетании с признаками системной воспалительной реакции, маркируемой высокими концентрациями СРБ, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли альфа в сыворотке крови. На данном этапе атерогенеза величина ЛВСЛ значимо отличается от значений, характерных для здоровых лиц. Показано, что чем больше значение ЛВСЛ, тем выше у этих больных функциональный класс хронической сердечной недостаточности (R = 0,4; p = 0,02). У больных ИБС с первичной нестабильной стенокардией выявлена максимальная величина ЛВСЛ, а у пациентов с ультразвуковыми признаками нестабильности бляшек — высокие концентрации СРБ в нейтрофильных супернатантах. Корреляционный анализ выявил, что у больных ИБС средний процент стеноза коронарных артерий, по данным ангиографии, напрямую взаимосвязан с величиной ЛВСЛ (R = 0,7; p = 0,03) и сывороточной концентрацией ФНО-альфа (R = 0,5; p = 0,03), а количество клинически значимых стенозов — с величиной ЛВСЛ (R = 0,4; p = 0,04) и концентрацией в супернатантах VIIф (R = 0,5; p = 0,04).*** *Заключение.* ***Величина ЛВСЛ, содержание СРБ и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах у больных ИБС взаимосвязаны с тяжестью и активностью атеросклеротического поражения артерий, что подтверждается результатами обследования больных на этапе доклинического, клинически манифестного стабильного и нестабильного атеросклеротического поражения.***

Ключевые слова: ***атеросклероз, нейтрофилы, врожденный иммунитет, воспаление, ишемическая болезнь сердца.***

Summary
Purpose. ***The study of protein-producing and lipid-releasing ability of neutrophils and its clinical significance in patients with IHD.*** *Materials and methods.* ***25 patients with arterial hypertension without clinical and ultrasound manifestations of atherosclerosis were examined; 47 patients with coronary artery disease with stable angina, as well as 19 patients with unstable primary angina. The comparison group — 33 healthy persons. In the serum, enzyme-linked immunosorbent assay was used to evaluate the concentration of C-reactive protein (CRP), lipoprotein a (LPa), VII coagulation factor VII (VIIf), defensins-alpha (1–3), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). Leukocytes, predominantly represented by neutrophils, which were further cultivated, were excreted from peripheral blood in the presence of dextrans; the levels of CRP, LPa, defensins-alpha (1–3), VIIf, and lipid-releasing ability of leukocytes (LRAL) were assessed according to the method of A. V. Tuev and V. Yu. Mishlanov. An angiographic study, duplex scanning arteries, and echocardiography were performed.*** *Results.* ***It has been established that in patients at the stage of preclinical atherosclerotic lesion, the ability of leukocytes to form protein-lipid complexes (PLC), marked by LRAL, practically does not differ from healthy individuals, but already at this stage of atherogenesis an increase in their ability to produce antimicrobial peptides — defensins-alpha (1–3). In patients with coronary artery disease with stable angina pectoris, an increase in leukocyte production of a wide range of proteins — defensins-alpha (1–3), VIIf, LPA and CRP in combination with signs of a systemic inflammatory reaction, marked by high concentrations of CRP, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in serum, was noticed. At this stage of atherogenesis, the value of LRAL is significantly different from the values of healthy individuals. It is shown that the higher the LRAL value, the higher the functional class of chronic heart failure in these patients (R = 0.4; p = 0.02). In patients with coronary artery disease with primary unstable angina, the maximum LRAL value was detected, and in patients with ultrasound signs of plaque instability, high concentrations of CRP in neutrophilic supernatants were found. Correlation analysis revealed that, in patients with coronary artery disease, the average percentage of coronary artery stenosis, according to angiography, is directly related to the LRAL value (R = 0.7; p = 0.03) and the serum concentration of TNF-alpha (R = 0.5; p = 0.03), and the number of clinically significant stenoses — with the magnitude of LRAL (R = 0.4; p = 0.04) and the concentration in supernatants VIIf (R = 0.5; p = 0.04).*** *Conclusion.* ***The LRAL value, CRP and defensin-alpha content in leukocyte supernatants in IHD patients are interconnected with the severity and activity of atherosclerotic lesion of arteries, which is confirmed by the results of examination of patients at the stage of preclinical, clinically manifest stable and unstable atherosclerotic lesion.***

Key words: ***atherosclerosis, neutrophils, innate immunity, inflammation, coronary heart disease.***

Список сокращений

AUC — Area Under Curve, P — persentile, ROC — Receiver Operator Characteristic, VIIф — VII фактора свертывания крови, АГ — артериальная гипертензия, БЛК — белково-липидные комплексы, БПСН — белокпродуцирующая способность нейтрофилов, ИФА — иммуноферментный анализ, ИЛ-6 — интерлейкин-6, ИЛ-8 — интерлейкин-8, ИБС — ишемическая болезнь сердца, КАГ — коронароангиография, ЛВСЛ — липидвысвобождающая способность лейкоцитов, ЛПа — липопротеин-а, мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота, СРБ — С-реактивный белок, ХС — холестерин, ФНО-альфа — фактор некроза опухоли альфа.

Введение

Основой патогенеза ишемической болезни сердца (ИБС) является атеросклероз — патологический процесс, сущность которого, несмотря на многочисленные исследования, на сегодняшний день остается не до конца изученной. К настоящему времени сложилось четкое представление об атеросклерозе как о мультифакториальном заболевании, в основе которого лежат сложные нарушения биохимических, иммунных и молекулярно-генетических процессов.

Вне зависимости от этиологического фактора, запускающего атеросклеротический процесс, непременными участниками его патогенеза являются лейкоциты. Участие в процессах атерогенеза моноцитов, лимфоцитов достаточно хорошо изучено. Малоисследованной остается роль в процессах атерогенеза самой многочисленной фракции лейкоцитов — нейтрофилов. Несмотря на короткий период своей жизни, лейкоциты за счет своей многочисленности и функциональной активности составляют основную линию защиты человека против бактериальных агентов, участвуют в механизмах неспецифической защиты, в том числе и врожденного иммунитета.

Роль и место нейтрофилов в процессах атеросклеротического повреждения сосудистой стенки активно изучается последние 15–20 лет. Это обусловлено появившимися в начале XXI века данными о связи количества нейтрофилов с риском инфаркта миокарда (ИМ) [1]; кроме того, показана более сильная предикторная значимость в прогнозировании сосудистых событий количества нейтрофилов периферической крови, чем высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ) [1]. В экспериментальном исследовании на крысах Van Leveen M., *et al.* (2004) впервые показали возможность развития спонтанной нейтрофильной инфильтрации сосудистой стенки [2]. Последующие работы Zerneke A., *et al.* (2009) продемонстрировали, что введение антинейтрофильных антител замедляло развитие атеросклероза у кроликов при наложении сосудистых муфт [3].

Установлено, что нейтрофилы в процессе атерогенеза проникают в артерии, где их непродолжительный срок службы увеличивается под влиянием воспалительных цитокинов. Это способствует дальнейшему прогрессированию воспаления и нестабильности бляшки. Механизмы, с помощью которых нейтрофилы способствуют дестабилизации бляшки, по-прежнему находятся на стадии изучения, но выяснено, что они связаны с высвобождением активных форм кислорода, миелопероксидазы, протеолитических ферментов, метаболитов арахидоновой кислоты и ряда белков [4].

Нейтрофилы в условиях межклеточного контакта или стимуляции провоспалительными цитокинами синтезируют и высвобождают пептиды и белки, связывающие холестерин (ХС) [5]. Предполагается, что такая способность клеток реализуется не в кровотоке, а в очаге воспаления или сосудистой стенке. Мишлановым В.Ю. и Туевым А.В. (1999) предложен метод регистрации общего количества белков и пептидов, синтезируемых и высвобождаемых нейтрофилами, которые связывают холестерин (ХС),— определение липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВСЛ) [6, 7, 8]. Было показано, что величина ЛВСЛ связана с функциональной активностью нейтрофилов. Об этом свидетельствовали эксперименты с определением концентрации ХС в супернатантах после выделения клеток в градиенте фиколл-верографин 1077 и при отстаивании в растворе декстрана. Клетки крови, выделенные на градиенте плотности фиколл-верографина 1077, были представлены преимущественно лимфоцитами (78–85%), а при отстаивании в декстране — на 70–80% нейтрофилами. При попытке определения концентрации ХС в супернатантах культур клеток, выделенных в градиенте плотности фиколл-верографина 1077, результаты оказались приблизительно в 3,6 раза ниже, чем в случаях отстаивания в присутствии раствора декстрана (согласно методике определения ЛВСЛ) [6, 7, 8]. Определяющая роль нейтрофилов в формировании величины ЛВСЛ подтверждена в исследованиях, которые показали, что нейтрофилы больных ИБС демонстрируют значимо бóльшую выживаемость в ходе культивирования, чем у здоровых лиц. Кроме того, корреляционный анализ установил взаимосвязь между способностью нейтрофилов выживать в условиях культивирования и высвобождением холестерина ($R = 0,49$; $p = 0,02$) [6].

Продолжением этих работ явилось изучение белковой продукции нейтрофилами в тех же условиях с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), данная функциональная активность названа белокпродуцирующей способностью нейтрофилов (БПСН) [9]. Похожий методический подход использовался Blidberg K. (Каролинский университет, 2012), когда в ходе культивирования нейтрофилов больных бронхо-легочными заболеваниями оценивали содержание в супернатантах молекул адгезии [10].

Оставалась недостаточно изученной специфика ЛВСЛ и БПСН у больных, имеющих только факторы риска атеросклеротического поражения коронарного русла (артериальная гипертензия [АГ] и курение), клинически стабильную (стабильная стенокардия напряжения) и нестабильную (первичная нестабильная стенокардия) форму ИБС, а также взаимосвязь данной функциональной способности нейтрофилов со структурным и функциональным состоянием сердечно-сосудистой системы.

Целью исследования было изучение белокпродуцирующей и липидвысвобождающей способности нейтрофилов и ее клинической значимости у больных ИБС.

Материал и методы

Выполнено рандомизированное одномоментное сравнительное исследование. Всего в исследование было включено 124 лица. Группу больных с факторами риска атеросклероза

составили 25 пациентов с артериальной гипертензией (АГ) без клинических и ультразвуковых манифестаций атеросклероза (средний возраст — 56,5 года (Me); персентиль (P) 10% — 47,3; P 90% — 65,2 года); с локализованным неосложненным течением атеросклероза — 47 больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения (средний возраст 60,2 года; P 10% — 50,2; P 90% — 70,0 года), а также с осложненным течением атеросклероза — 19 больных первичной нестабильной стенокардией по классификации Ю. Браунвальда (средний возраст — 60,3 года; P 10% — 55,4, P 90% — 64,2 года). В исследование не включались пациенты с сахарным диабетом, острыми и хроническими заболеваниями с воспалительным синдромом, перенесшие острые сосудистые события в течение предшествующих 6 месяцев. Все группы клинически манифестного атеросклероза имели ассоциацию с АГ. Группу сравнения составили 33 практически здоровых человека (средний возраст — 52,7 года; P 10% — 41,2; P 90% — 62,3 года). Группы наблюдения и сравнения были сопоставимы по возрастному и половому составу. Процент курящих в группе больных АГ составил 59%, стабильной стенокардией напряжения — 73%, первичной нестабильной стенокардией — 71%. Среди здоровых лиц курящих не было. Атеросклеротическое поражение верифицировалось на основании клинических признаков, дуплексного сканирования и ангиографии. Для оценки тяжести хронической сердечной недостаточности (ХСН) всем пациентам групп наблюдения выполнялись тест шестиминутной ходьбы и ультразвуковое исследование сердца. Все пациенты с клинически манифестным атеросклерозом получали стандартную терапию статинами, аспирином, ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента и β-блокаторами.

Исследование ЛВСЛ проводилось в иммунологической лаборатории ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера по авторскому методу А.В. Туева и В.Ю. Мишланова [6]. Для этого из венозной крови больного в стерильных условиях выделяли лейкоцитарную взвесь, используя метод отстаивания в центрифужных пробирках смеси венозной крови и раствора полиглюкина в соотношении 5:3. Суспензию лейкоцитов тщательно отмывали от полиглюкина сначала путем осторожного ресуспендирования в физиологическом растворе хлорида натрия с последующим центрифугированием для осаждения клеток, затем отмывку производили в питательной среде «Игла». После отмывки лейкоциты ресуспендировали в питательной среде. Проводили количественный подсчет выделенных клеток и готовили взвесь, содержащую 50000 лейкоцитов в 1 мкл среды. Соотношение лейкоцитов в выделенной суспензии приближалось к таковому в цельной крови при значительном преобладании нейтрофилов (60–80%). После строгого количественного учета 400 мкл суспензии лейкоцитов культивировали при 37 °С в течение 3 суток в неполной питательной среде в пенициллиновых флаконах. Через 3 суток в надосадочной жидкости определяли содержание ХС холестериноксидазным методом (тест-набор фирмы Human).

Для уточнения механизмов регуляции ЛВСЛ у больных ИБС выполнено экспериментальное исследование *in vitro*, заключавшееся в определении влияния ФНО-альфа на величину ЛВСЛ, для чего проводилось ее определение в контрольной (с внесенной из вне 20 мкл питательной среды) и опытной (с внесенным из вне 20 мкл раствора ФНО-альфа в конечной концентрации 0,005 мкг/мл) культурах лейкоцитов (выполнено девять экспериментов).

Посредством ИФА оценивался белково-пептидный паттерн сыворотки крови и супернатантов трехсуточных лейкоцитарных культур (по методике Мишланова В.Ю. и Владимирского В.Е. [9]). В сыворотке крови определялась концентрация интерлейкинов –6 и –8 (ИЛ-6, ИЛ-8, тест-наборы фирмы «Вектор-Бест Урал», Новосибирск), фактора некроза опухоли α (ФНО-альфа, тест-набор фирмы «Вектор-Бест Урал», Новосибирск), дефензинов-альфа (1–3) с помощью тест-набора фирмы Hycult Biotech, липопротеина (а) (ЛПа, набор фирмы Assa Pro), С-реактивного белка (СРБ, тест-набор фирмы «Вектор-Бест Урал», Новосибирск), VII фактора свертывания крови (VIIф, набор фирмы Assa Pro). В супернатантах трехсуточных культур нейтрофилов оценивалось содержание дефензинов-альфа 1–3, СРБ, VIIф, ЛП (а).

Выбор изученных белков и пептидов обусловлен следующими факторами: их причастностью к системе врожденного иммунитета (СРБ, дефензины-альфа, цитокины) [11, 12], способностью отграничивать патологический очаг как простейший механизм палеоиммунитета (VIIф, ЛПа) [13, 14, 15], формировать БЛК (СРБ, дефензины-альфа, ЛПа, VIIф) [11, 15], доказанной атерогенностью (СРБ, дефензины-альфа, ЛПа) [11, 12, 14], а также возможностью лейкоцитов их продуцировать (СРБ, дефензины, VIIф) [11, 12, 14].

Статистическая обработка результатов производилась при помощи программного пакета Statistica 8.0. Оценка статистической значимости отличий признаков независимых друг от друга группировок проводилась по критерию Манна-Уитни. При сравнении трех и более групп для оценки межгрупповых различий использовался критерий Крускала-Уоллиса. Для определения наличия связи между признаками использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Точность и эффективность диагностических тестов определялась путем построения ROC-кривых (Receiver Operator Characteristic). Для интерпретации использовался показатель AUC (Area Under Curve) — площадь под кривой. Для оценки дифференциально-диагностической значимости паттерна изучаемых факторов применялся метод логистической регрессии. В последующем использовался ROC-анализ для оценки диагностической эффективности полученной математической модели, комплексно характеризующей изучаемые показатели. Количественные данные представлены в виде медианы (Me), перцентиля (P) 10 и 90%.

Результаты

В нашем исследовании показано, что у больных АГ в сравнении со здоровыми лицами оказалось достоверно выше содержание в сыворотке крови ЛПа и дефензинов-альфа (см. табл.). При этом в лейкоцитарных супернатантах пациентов с АГ выявлялась значимо более высокая концентрация дефензинов-альфа, чем у здоровых, что может указывать на изменение способности лейкоцитов к высвобождению факторов противоинфекционной защиты в отсутствии очагов инфекции. В группе больных АГ ЛВСЛ только в 32% случаев превышала значения здоровых лиц.

Таблица

Статистическая значимость различий изучаемых биомаркеров у здоровых лиц, больных АГ без клинических проявлений атеросклероза и ИБС со стабильной стенокардией напряжения

Показатель, единицы измерения	Группа 1 здоровые лица, Me (percentile 10/90) (n = 33)	Группа 2 больные АГ, Me (percentile 10/90) (n = 25)	Группа 3 больные ИБС со стабильной стенокардией напряжения, Me (persentile 10/90) (n = 47)	p (группы 1–2) статистика U Манна-Уитни	p (группы 1–3), статистика U Манна-Уитни	p (группы 2–3), статистика U Манна-Уитни	p (группы 1–2–3), критерий Крускала-Уоллиса
ЛВСЛ, ммоль/л	0,13 (0,1/0,15)	0,12 (0,07/0,16)	0,16 (0,09/0,25)	0,67	0,010	0,001	0,0001
СРБ в сыворотке крови, мг/л	2,30 (0,22/2,3)	4,12 (1,66/15,25)	6,99 (1,88/10,29)	1,00	0,001	0,740	0,0001
СРБ в супернатанте, мкг/л	18,34 (1,7/32,6)	55,9 (18,3/130,0)	49,57 (16,25/106,00)	1,00	0,001	0,650	0,0060
ЛПа в сыворотке крови, нг/мл	8,68 (5,66/8,68)	39,89 (22,05/68,75)	42,65 (26,90/40,50)	0,04	0,001	0,230	0,0001
ЛПа в супернатанте, нг/мл	25,60 (13,53/45,85)	52,19 (32,5/84,00)	37,73 (23,55/55,25)	1,00	0,001	0,510	0,0020
VIIф в сыворотке крови, нг/мл	1,92 (0,8/1,92)	4,93 (2,53/7,28)	5,59 (3,34/8,80)	1,00	0,001	0,780	0,0001
VIIф в супернатанте, нг/мл	0,26 (0/0,51)	2,37 (0,78/4,74)	2,38 (0,72/4,51)	1,00	0,001	0,850	0,0001
Дефензины альфа в сыворотке крови, пг/мл	626 (270/1376)	6577 (3390/11296)	4389 (2096/7932)	0,01	0,030	0,090	0,0001
Дефензины альфа в супернатанте, пг/мл	117206 (11420/200000)	518428 (109300/863000)	656635 (406000/921150)	0,05	0,010	0,020	0,0001
ИЛ 6 в в сыворотке крови, пг/мл	1,04 (0,8/1,5)	2,48 (0,11/7,30)	12,67 (1,3/52,64)	0,16	0,001	0,001	0,0001
ИЛ 8 в сыворотке крови, пг/мл	5,34 (0/24,4)	8,52 (0/27,3)	48,13 (0,00/154,25)	0,06	0,001	0,090	0,3000
ФНО-альфа в сыворотке крови, пг/мл	3,9 (1,1/7,9)	6,19 (1,8/12,8)	29,67 (1,45/66,05)	0,09	0,001	0,010	0,0430

Примечание: VIIф — VII фактор свертывания крови, АГ — артериальная гипертензия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИЛ-6 — интерлейкин-6, ИЛ-8 — интерлейкин-8, ЛВСЛ — липидвысвобождающая способность лейкоцитов, ЛПа — липопротеин-а, СРБ — С-реактивный белок, ФНО-альфа — фактор некроза опухоли альфа.

Группа больных ИБС была представлена лицами с II (18 %) и III функциональным классом (82 %) стенокардии напряжения. По данным коронароангиографии (КАГ), средний процент выявленного стеноза составил 76 (Р 10 % — 30; Р 90 % — 96)%, а количество клинически значимых стенозов — 3 (Р 10 % — 1; Р 90 % — 5).

Показано, что у пациентов с ИБС содержание всех изучаемых показателей в сыворотке и супернатантах было выше, чем у практически здоровых лиц (табл. 1).

Особенностью пациентов данной группы является то, что у них выявлена прямая зависимость между величиной ЛВСЛ и содержанием дефензинов-альфа (R = 0,47; p = 0,03) в лейкоцитарных супернатантах, что свидетельствует о возможной общности процессов продукции лейкоцитами этих пептидов и образования БЛК. Корреляционный анализ выявил, что средний процент стеноза коронарных артерий, по данным КАГ, напрямую взаимосвязан с величиной ЛВСЛ (R = 0,7; p = 0,03) и сывороточной концентрацией ФНО-альфа (R = 0,5; p = 0,03), а количество клинически значимых стенозов — с величиной ЛВСЛ (R = 0,4; p = 0,04) и концентрацией в супернатантах VIIф (R = 0,5; p = 0,04). Показано, что чем больше значение ЛВСЛ, тем выше функциональный класс ХСН, определенный с учетом результатов теста шестиминутной ходьбы (R = 0,4; p = 0,02). Установлены прямая умеренной силы связь величины ЛВЛС с конечно-диастолическим размером левого желудочка (R = 0,34; p = 0,01), средним давлением в легочной артерии (R = 0,46; p = 0,02), а также отрицательного характера зависимость с фракцией выброса левого желудочка (R = –0,35; p = 0,008).

Было произведено сравнение результатов специального обследования больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с АГ с данными, полученными у пациентов с АГ без клинически манифестного атеросклероза. Показано, что величина ЛВСЛ, концентрации дефензинов-альфа в супернатантах, а в сыворотке ИЛ-6 и ФНО-альфа достоверно выше у больных ИБС (см. табл.). Определены точки разделения по изучаемым показателям между больными ИБС со стабильной стенокардией напряжения и АГ путем построения ROC-кривых. Концентрации дефензинов-альфа в супернатанте более 300214 пг/мл, ИЛ-6 в сыворотке крови более 2,58 пг/мл и величина ЛВСЛ выше 0,15 ммоль/л являются хорошими разделительными критериями между больными ИБС стабильного течения и АГ (по критерию AUC), а содержание ФНО-альфа в сыворотке крови свыше 12,23 пг/мл — средним по эффективности показателем. Для комплексной оценки различий белково-пептидного паттерна больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и АГ выбраны значения концентрации

дефензинов-альфа в супернатантах, ИЛ-6 и ФНО-альфа в сыворотке крови, а также величина ЛВСЛ, на основании которых построено уравнение логистической регрессии:

$$y = -9{,}545 + 36{,}288*x_1 + 0{,}000022028*x_2 + 0{,}04186*x_3 + 0{,}07562*x_4,$$

где x_1 — величина ЛВСЛ, x_2 — концентрация дефензинов-альфа в супернатантах, x_3 — концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови и x_4 — концентрация ФНО-альфа в сыворотке крови (p [правдоподобия] = 0,001). Данный комплексный подход к дифференциальной диагностике этих заболеваний имел очень хорошую разделительную эффективность (AUC = 0,83).

Среди пациентов с первичной нестабильной стенокардией 44 % имели клинику прогрессирующей стенокардии, 31 % — острой и 25 % — подострой стенокардии покоя. Средний процент стеноза коронарных артерий составил 71 (P 10 % — 38; P 90 % — 93)%, а количество клинически значимых стенозов — 2 (P 10 % — 1; P 90 % — 3).

Статистический анализ различий изучаемых показателей у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией показал, что у больных ИБС нестабильного течения величина ЛВСЛ была значимо выше (0,21 [P 10 % — 0,19; P 90 % — 0,24] ммоль/л), чем у пациентов со стабильным течением (0,16 [P 10 % — 0,09; P 90 % — 0,25] ммоль/л) (p = 0,041). Путем построения ROC-кривых определена разделительная эффективность изученных биомаркеров между больными со стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией. Значение ЛВСЛ у больных ИБС нестабильного течения более 0,18 ммоль/л (AUC = 0,77) расценивалось как хороший по эффективности разделительный критерий стабильного и нестабильного течения заболевания.

При разделении группы пациентов с ИБС по принципу выявления у них признаков нестабильных и стабильных атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий установлено, что из всех факторов наилучшую разделительную эффективность между этими подгруппами имеет значение концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л (AUC = 0,95), кроме того, установлена сильная прямая зависимость нестабильного характера атеросклеротической бляшки по данным дуплексного сканирования с содержанием СРБ в лейкоцитарных супернатнтах (R = 0,82; p = 0,03).

В проведенном экспериментальном исследовании *in vitro* установлено, что во всех девяти экспериментах добавление в культуральную среду ФНО-альфа в дозе 0,005 мкг/мл вызывало повышение величины ЛВСЛ. ЛВСЛ до внесения препарата составила 0,15 (P 10 % — 0,09; P 90 % — 0,18), после — 0,35 (P 10 % — 0,19; P 90 % — 0,46) ммоль/л. Различие между группами статистически достоверно (p = 0,027).

Обсуждение и заключение

Нами получены данные, подтверждающие большое значение нейтрофилов в процессах атеросклеротического поражения сосудов. Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют о возможности регуляции ЛВСЛ у больных ИБС провоспалительными цитокинами, в частности ФНО-альфа, что указывает на то, что нейтрофилы в условиях тесного межклеточного контакта способны не только пассивно (в результате гибели), но и активно образовывать БЛК. В пользу способности нейтрофилов к активному образованию БЛК свидетельствуют опубликованные данные о связи величины ЛВСЛ и выживаемости нейтрофилов в культурах [6].

Термин «белокпродуцирующая способность нейтрофилов» использован для совокупной характеристики нескольких функций нейтрофилов: белоксинтезирующей способности, процессинга белковых молекул и голокриновой секреции. С учетом проведенных исследований, построенных математических моделей белково-пептидных паттернов в группе больных ИБС, удалось установить, что для них характерен широкий спектр провоспалительных и атерогенных белков, обнаруживаемых в лейкоцитарных супернатантах в высоких концентрация, но наибольшее значение имеют дефензины альфа и СРБ.

Нами не предполагалось изучение полного спектра контролирующих воспаление факторов, продуцируемых нейтрофилами, так как это является приоритетом отдельного патофизиологического исследования. Выбор дефензинов-альфа определен имеющимся у них особым набором проатерогенных свойств. Дефензины-альфа и липопротеины низкой плотности образуют стабильные комплексы в растворе и на поверхности клеток [5]. В связи с этим альфа-дефензины, секретируемые активированными нейтрофилами, обеспечивают связь между воспалением и атеросклерозом, изменяя катаболизм от рецепторного пути на менее эффективный рецепторнезависимый путь, опосредованный протеогликанами. Дефензины увеличивают тропность ЛПа к эндотелию примерно в четыре раза, а к гладкомышечным клеткам — примерно в шесть раз [5]. Кроме того, дефензины-альфа тормозят фибринолиз, опосредованный тканевым плазминогеном. Этот процесс способствует развитию атеросклеротических поражений [5].

СРБ синтезируется в основном в печени, хотя установлено, что белок могут синтезировать нейроны, клетки почек, моноциты, лимфоциты и макрофаги альвеол. Одно время считали, что СРБ может синтезироваться атеросклеротическими бляшками, так как уровень СРБ в них на порядок выше, чем в окружающих тканях, однако было установлено, что СРБ синтезируют находящиеся в бляшках макрофаги и гладкомышечные клетки. Показано, что эндотелиоциты аорты человека не только содержат матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) СРБ, но синтезируют и секретируют СРБ. Нами подтверждены известные данные о возможности внепеченочного синтеза СРБ мононуклеарами периферической крови [16], о чем свидетельствует обнаружение данного белка в супернатантах трехсуточных нейтрофильных культур. Касательно VIIф также известна возможность синтеза данной сериновой протеиназы лейкоцитами (работы З. С. Баркагана), что объясняет результаты нашей работы, связанные с обнаружением посредством ИФА в трехсуточных супернатантах нейтрофильных культур этого фактора.

В нашем исследовании получены данные о взаимосвязи величины ЛВСЛ, интегрально характеризующей способность нейтрофилов к образованию БЛК с распространенностью и тяжестью атеросклеротического поражения по данным КАГ, концентрации СРБ в нейтрофильных супернатантах с нестабильным характером атеросклеро-

тических бляшек по данным дуплексного сканирования. Показана эволюция БПСН и ЛВСЛ на этапах доклинических атеросклеротических проявлений, клинически манифестного стабильного и нестабильного атерогенеза.

Участие механизмов врожденного иммунитета в патогенезе ХСН без инфекционной индукции — известный научный факт [17]. Взаимосвязь системы врожденного иммунитета, воспаления и ХСН двояка. С одной стороны, воспаление способствует структурным изменениям сердца (прямое негативное влияние на сократимость, развитие гипертрофии и фиброза миокарда, нарушение митохондриальной генерации энергии, апоптоз, развитие эндотелиальной дисфункции и тромбофилии). С другой — гиперцитокинемия, свойственная ХСН, пролонгирует срок жизни лейкоцитов (нейтрофилов) в сосудистой стенки, увеличивая тем самым величину ЛВСЛ и продукцию ряда белков. Этот факт объясняет наличие корреляции тяжести ХСН и величины ЛВСЛ.

На основании проведенного анализа научной литературы и собственных данных предложена концепция дезадаптации механизмов воспаления и врожденного иммунитета у больных атеросклерозом, состоящая в том, что процесс формирования атеросклеротических поражений следует рассматривать как измененную активность механизмов, связанных с эволюционно сформированной системой белковой продукции лейкоцитами, в первую очередь нейтрофилами, выступающей как компонент ограничения и уничтожения чужеродных антигенов. В ответ на типоспецифическую стимуляцию различными факторами, такими как окисленные липиды, компоненты клеточных стенок микробных агентов, происходит активация toll-like и других распознающих рецепторов системы врожденного иммунитета [18], имеющихся на мембранах нейтрофилов, последними запускаются механизмы продукции ряда белково-пептидных агентов, например дефензинов-альфа и СРБ. Процесс высвобождения нейтрофилами белков регулируется также опосредованно через взаимодействие с другими клетками. Часть высвобождаемых белково-пептидных факторов синтезируются непосредственно нейтрофилами (дефензины-альфа, VIIф, СРБ), другие накапливаются в цитоплазме последних в ходе процесса интернизации, то есть прижизненного обмена клеточными компартментами с другими клетками [15]. Действие каждого из высвобождаемых факторов направлено на отграничение чужеродного агента путем его непосредственного уничтожения (СРБ и дефензины-альфа), ограничения регионального кровотока — тромбоза (VIIф, ЛПа) или путем активации неоангиогенеза (ЛПа). Однако генетически предопределенная система реагирования на вторжение чужеродных агентов в условиях постоянной стимуляции (дислипидемия, АГ и другие факторы) носит дезадаптивный характер и способствует атерогенезу.

Таким образом, величина ЛВСЛ, содержание СРБ и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах у больных ИБС взаимосвязаны с тяжестью и активностью атеросклеротического поражения артерий, что подтверждается результатами обследования больных на этапе доклинического, клинически манифестного стабильного и нестабильного атеросклеротического поражения.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Список литературы

1. *Baetta R., Corsini A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: Current state and future perspectives. Atherosclerosis 2010; 210 (1): 1–13. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.028.*
2. *van Leeuwen M., Gijbels M. J., Duijvestijn A., et al. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR-/- mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 84–89. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.154807.*
3. *Zernecke A., Bot I., Djalali-Talab Y., et al. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. Circ Res 2008; 102: 209–217. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.160697.*
4. *Weber C., Zernecke A., Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. Nat Rev Immunol 2008; 8: 802–815. DOI: 10.1038/nri2415.*
5. *Higazi A., Nassar T., Ganz T., Rader d., et al. The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis. Blood 2000; 96 (4): 1393–8. PMID: 10942383.*
6. *Mishlanov V. Yu., Tuev A. V., Shutov A. A. i dr. Method lipid-releasing leukocytes ability in the diagnosis of mechanisms atherogenesis in patients with coronary heart disease and cerebral ischemic stroke. Klin. lab. Diagnostika 2006; 5: 9–12. Russian (Мишланов В. Ю., Туев А. В., Шутов А. А. и др. Метод липидвысвобождающей способности лейкоцитов в диагностике механизмов атерогенеза у больных ишемической болезнью сердца и мозговым ишемическим инсультом. Клиническая лабораторная диагностика 2006; 5: 9–12).*
7. *Mishlanov V. Yu., Sandakov P. Ya., Vladimirskij V. E. i dr. Proteinsynthetic function of neutrophils and lipid-releasing leukocytes ability in patients with atherosclerosis. Clinical Medicine 2013; 91 (12): 17–21. Russian (Мишланов В. Ю., Сандаков П. Я., Владимирский В. Е. и др. Протеинсинтезирующая функция нейтрофилов и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных атеросклерозом / Клиническая медицина 2013; 91 (12): 17–21.*
8. *Burtseva T. V., Mishlanov V. Yu., Tuev A. V. i dr. Levels of serum biomarkers and lipid-releasing leukocytes ability in arterial hypertension and ischemic heart disease with different severity of heart failure. Vrach-aspirant 2011; 3 (3): 482–489. Russian (Бурцева Т. В., Мишланов В. Ю., Туев А. В. и др. Показатели сывороточных биомаркеров и липидвысвобождающей способности лейкоцитов при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца с разной степенью тяжести сердечной недостаточности. Врач-аспирант 2011; 3 (3): 482–489).*
9. *Vladimirskij V. E. Protein-producing function of neutrophils in patients with coronary atherosclerosis. Modern problems of science and education 2015; 1: URL: www.science-education.ru/121–17420 Russian (Владимирский В. Е. Белокпродуцирующая функция нейтрофилов у больных коронарным атеросклерозом. Современные проблемы науки и образования 2015; № 1: URL: www.science-education.ru/121–17420).*
10. *Blidberg K1, Palmberg L, Dahlén B, et al. Chemokine release by neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. Innate Immun 2012; 18 (3): 503–10. doi: 10.1177/1753425911423270.*
11. *Rudolf J., Lewandrowski B. Cholesterol, Lipoproteins, High-sensitivity C-reactive Protein, and Other Risk Factors for Atherosclerosis. Clinics in Laboratory Medicine 2014; 34: 113–127. DOI: 10.1016/j.cll.2013.11.003.*
12. *Nassar H., Lavi E., Akkawi Sa'ed, Bdeir K. et al. a-Defensin: Link between inflammation and atherosclerosis. Atherosclerosis 2007; 194: 452–457. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.046.*
13. *Schoneveld Michelle A. H., Hoefer. I, Sluijter J. P.G. et al. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. Atherosclerosis 2008; 197 (1): 95–104.*
14. *Nordestgaard B. J., Chapman M. J., Ray K. Lipoprotein (a) as a cardiovascular risk factor: current status. Eur Heart J.2010; 31: 2844–2853. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq386.*
15. *Silveira A., Scanavini D., Boquist S. et al. Relationships of plasma factor VIIa-antithrombin complexes to manifest and future cardiovascular disease. Thrombosis Research 2012; 130: 221–225. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.08.02.*
16. *Haider DG, Leuchten N., Schaller G. et al. C-reactive protein is expressed and secreted by peripheral blood mononuclear cells. Clin Exp Immunol. 2006; 146 (3): 533–539. DOI: 10.1111/j.1365–2249.2006.03224.*
17. *Frantz S., Bauersachs J., Kelly R. Innate immunity and the heart, 2005. Current Pharmaceutical Design 2005; 11: 1279–1290. DOI: 10.2174/1381612053507512.*
18. *Moreno J. A., Ortega-Gomez A., Delbosc S. In vitro and in vivo evidence for the role of elastase shedding of CD 163 in human atherothrombosis. Eur Heart J. 2012; 33: 252–263. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr123.*

Для цитирования. Мишланов В. Ю., Владимирский В. Е., Туев А. В. Функциональная способность нейтрофилов у больных ишемической болезнью сердца // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория».— 2019 — Т. 3.— 22(397).— С. 62–67.