

БЕЛОКПРОДУЦИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Владимирский В.Е.

ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия (614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26), e-mail: vladimirskii_v@mail.ru

Проведено клиническое и экспериментальное исследование белокпродуцирующей функции нейтрофилов у больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Всем пациентам выполнялось изучение концентрации С-реактивного белка (СРБ), липопротеина (а) (ЛП (а)), дефензинов альфа (1-3), фактора Виллебранта (ФВ), NT предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP), VII фактора свертывания крови (VII ф) в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах, а также величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов. В эксперименте установлен факт роста концентрации proBNP в лейкоцитарных супернатантах через 72 часа культивирования нейтрофилов в условиях тесного межклеточного контакта. У больных ИБС обнаружен паттерн биологически активных белков, характеризующийся высокой концентрацией в сыворотке СРБ, ЛП(а), NT-proBNP, дефензинов альфа (1-3), а в лейкоцитарных супернатантах-дефензинов альфа 1-3, СРБ, ЛП (а), NT-proBNP, VII ф и ФВ. В исследовании установлено, что у больных ИБС с хронической сердечной недостаточностью обнаружена корреляция между процессами субклинического воспаления, содержанием в супернатантах лейкоцитарных культур дефензинов альфа (1-3), а в сыворотке крови СРБ и дефензинов альфа с процессами ремоделирования сердца и тяжестью клинических проявлений.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, нейтрофил, белки.

PROTEINPRODUCER FUNCTION OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CORONARY ATHEROSCLEROSIS

Vladimirskiy V.E.

Perm State Medical University n.a. ac. E. A. Wagner, Perm, Russia (614000, Perm, street Petropavlovskaya, 26), e-mail: vladimirskii_v@mail.ru

The clinical and experimental research protein producer functions of neutrophils performed in patients with coronary heart disease (CHD). All patients underwent the research of the concentration of C-reactive protein (CRP), lipoprotein (a) (LPa), defensins alpha(1-3), the factor of Villebrandia (FV), NT fragment of precursor brain natriuretic peptide (NT-proBNP), factor VII clotting (VII f) in blood serum and leukocyte supernatant and values lipid-releasing leukocytes ability (LRLA). In the experiment established that the growing concentration of proBNP in leukocyte supernatant after 72 hours of cultivation a neutrophils in close cell-cell contact. In patients with CHD detected pattern of biologically active proteins, characterized by a high concentration in serum CRP, LP(a), NT-proBNP, defensins alpha (1-3), and in leukocyte supernatant - defensins alpha 1-3, CRP, LP (a), NT-proBNP, VII f and FV. In the study we found that in CHD patients with chronic heart failure discovered a correlation between the processes of subclinical inflammation, content into the supernatant leukocyte cultures defensins-alpha (1-3), and serum CRP and defensins-alpha with the process of cardiac remodeling and severity of clinical manifestations.

Keywords: coronary heart disease, atherosclerosis, neutrophil, proteins.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является широко распространенной и дорогостоящей неинфекционной эпидемией в западном мире. В США распространенность ИБС среди лиц старше 20 лет – 6,4 % (7,9 % среди мужчин и 5,1% среди женщин) [4]. В настоящее время распространенность ИБС в России составляет среди всего населения $13,5 \pm 0,1$ %, среди мужчин – $14,3 \pm 0,3$ %, среди женщин – $13,0 \pm 0,2$ % [3]. Атеросклероз, лежащий в основе этого заболевания, несмотря на длительный период его изучения, остается не до конца изученной проблемой современного здравоохранения.

В «фокусе» большинства современных концепций патогенеза атеросклеротического поражения сосудистой стенки значимая роль отводится лейкоцитам [7]. Много усилий предпринято для выяснения роли моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов в атерогенезе от его начальных этапов и до развития тромботических осложнений [5]. Напротив, роль полиморфно-ядерных нейтрофилов в развитии атеросклероза до недавнего времени изучалась недостаточно в связи с тем, что нейтрофильные инфильтраты редко обнаруживались в атеросклеротических бляшках по сравнению с другими воспалительными клетками [8]. Показано, что нейтрофилы в процессе атерогенеза проникают в артерии, где их непродолжительный срок службы продлевается воспалительными цитокинами. Это способствует дальнейшему прогрессированию воспаления и нестабильности бляшки [6]. В настоящем исследовании предпринята попытка изучить роль нейтрофилов и продуцируемых ими факторов у больных ИБС.

Цель исследования – изучить белокпродуцирующую функцию нейтрофилов у больных ИБС.

Материалы и методы исследования

Обследовано 66 пациентов с ИБС среднего возраста 60,2 (percentile 10 % – 50, percentile 90 % – 70) лет. Среди обследованных преобладали мужчины (75 %), некурящие (82 %), лица с отягощенным семейным анамнезом (62 %). Группу сравнения составили 33 практически здоровых человека среднего возраста 52,7 (percentile 10 % – 41, percentile 90 % – 62) лет. Среди них было 66 % мужчин, преобладали некурящие лица (62 %), у большинства обследованных не выявлялось отягощенного семейного анамнеза по атеросклерозу (72 %). Всем лицам групп наблюдения и сравнения выполнена, помимо общеклинического обследования (тест шестиминутной ходьбы с on-line мониторингом частоты сердечных сокращений [1], ультразвуковое исследование сердца и сосудов), специальная исследовательская программа, включавшая исследование посредством иммуноферментного анализа (ИФА) сывороточной концентрации С-реактивного белка (СРБ), липопротеина (а) (ЛП(а)), NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического белка (NT-proBNP), VII фактора свертывания крови (VIIф), дефензинов альфа (1-3), белка связывающего жирные кислоты (БСЖК), интерлейкина 6 (ИЛ-6), интерлейкина 8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), определение липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВСЛ) по методике А.В. Туева и В.Ю. Мишланова. Для решения цели исследования специально разработан метод определения при помощи ИФА содержания белков в лейкоцитарных супернатантах [2]. В супернатантах изучалось содержание СРБ, ЛП(а), дефензинов альфа (1-3), VIIф, NT-proBNP, фактора Виллебранда (ФВ).

В ходе исследования из группы больных ИБС отобраны 12 человек в возрасте от 57 до 63 лет для проведения экспериментальной работы *invitro*. Вся группа соответствовала III ФК стенокардии напряжения. У 8 пациентов (67 %) была выявлена ХСН на уровне III ФК (по NYHA), у 4-х пациентов (33 %) признаки ХСН на уровне II ФК (по NYHA). Эксперимент состоял в последовательном проведении лизиса лейкоцитов, выделенных от пациентов, исходно и через 72 часа культивирования в неполной среде Игла-М. В лейкоцитарных лизатах иммунохемилюминисцентным методом осуществлялась молекулярная диагностика содержания *proBNP* и *СРБ*.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведена оценка результатов экспериментальной части исследования. Исходно в лейкоцитарных лизатах содержалось в среднем 190 (80/340) мкг/л *СРБ*, концентрация которого через 72 существенно не изменилось и составила 154 (40/290) мкг/л. Динамика изменения концентрации показателя была статистически недостоверной ($p > 0,05$) (у 58 % содержание этого белка снизилось, а у 42 % повышалось). Исходная концентрация в лизатах *NT-proBNP* составила в среднем 22,7 (9/29) пг/мл, а через 72 часа культивирования возросла до 31,8 (12,1/31,5) пг/мл (у 78 % – повышалась, у 22 % – снизилась) ($p = 0,034$).

Эксперимент продемонстрировал, что в ходе культивирования в условиях тесного межклеточного контакта концентрация *NT-proBNP* достоверно возрастала. Данный факт косвенно свидетельствует в пользу возможности продукции *NT-proBNP* в культурах лейкоцитов, а также в тканях больных ИБС, осложненной ХСН. Отсутствие достоверной динамики содержания *СРБ* объясняется, по всей видимости, тем, что в экспериментальную группу были отобраны пациенты со стабильной формой ИБС, у которых значение в патогенезе заболевания этого белка ниже, чем у больных нестабильными формами этого заболевания. Можно предположить, что исходное содержание *СРБ* в нейтрофилах объясняется его синтезом на предшествующих этапах созревания нейтрофилов или моноцитов в костном мозге (конституциональный фактор).

Результаты исследования концентраций изучаемых сывороточных и лейкоцитарных факторов у больных ИБС представлены в таблице. Показано, что содержание всех изучаемых показателей в сыворотке и супернатантах было выше у больных ИБС, чем у практически здоровых лиц. Проведена оценка разделительной эффективности полученных различий содержания биомаркеров у больных ИБС и здоровых лиц посредством Receiver Operator Characteristic (ROC) анализа. Анализ значения Area Under Curve (AUC) показал, что концентрация в супернатанте дефининов альфа выше 210000 пг/мл и в сыворотке более 1000 пг/мл, а также содержание в супернатанте *NT-proBNP* более 27 пг/мл и ФВ свыше 0,41 ЕД/мл имеют отличную разделительную (от здоровых лиц) значимость у больных ИБС.

Содержание в супернатанте ЛПа свыше 40нг/мл расценивается как очень хороший разделительный критерий, а концентрация в супернатанте СРБ более 20мкг/л, VII фактора свертывания выше 1,1нг/мл и величина ЛВСЛ свыше 0,15 ммоль/л, как хороший. По полученным точкам деления построена диаграмма Парето (диаграмма 1), из которой видно, что у больных ИБС наиболее часто отмечаются высокие значения концентраций в лейкоцитарных супернатантах дефензиновальфа, ФВи NT-ргоBNP.

**Статистическая значимость различия между группой больных ИБС и здоровых лиц
(статистика U Манна – Уитни)**

Показатель	Группа больных ИБС Median (percentel 10/90)	Здоровые лица Median (percentel 10/90)	Достоверность различий (N>20),p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,17 (0,09/0,25)	0,13(0,1/0,15)	0,001
СРБв сыворотке, мг/л	6,87 (1,68/11,49)	2,30 (0,22/2,3)	0,001
СРБ в супернатанте, мкг/л	42,79 (10,4/91,2)	18,34 (1,7/32,6)	0,001
ЛПа в сыворотке, нг/мл	40,51 (29,5/40,4)	8,68 (5,66/8,68)	0,001
ЛПа в супернатанте, нг/мл	39,86 (25,3/56,3)	25,60 (13,53/45,85)	0,001
ФВ в супернатанте, ЕД/мл	1,10 (0,87/1,37)	0,04(0,01,0,05)	0,001
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	5,24 (2,79/8,63)	1,92 (0,8/1,92)	0,001
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	2,02 (0,52/4,1)	0,26 (0/0,51)	0,001
NT-ргоBNP в сыворотке, пг/мл	424,97 (29/1714)	39,38(0/120,35)	0,001
NT-ргоBNP в супернатанте, пг/мл	127,07 (11,05/222,89)	18,25 (0/35,39)	0,001
Дефензины альфа в сыворотке, пг/мл	4928,25(1864/8192)	626,37 (270,40/1376,00)	0,001
Дефензины альфа в супернатанте, пг/мл	654610,00(200000/949000)	117206,1(11420/200000)	0,001
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	12,70 (1,1/44,57)	1,04 (0,8/1,5)	0,001
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	39,25 (0/136,9)	5,34 (0/24,4)	0,02

Для комплексной оценки отличий от здоровых лиц белково-пептидного паттерна в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах больных ИБС выбраны концентрация в супернатантах СРБ, ЛПа, ргоBNP, VII факторы свертывания, дефензинов, а также сывороточное содержание дефензинов и величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии: $y=0,143+0,063*x1- 0,00121*x2+0,0013*x3+0,0829*x4+0,0009249*x5+0,000030808*x6+$

$0,000000549*x7$, где $x1$ – величина ЛВСЛ, $x2$ – концентрация в супернатантах СРБ, $x3$ – концентрация в супернатантах ЛПа, $x4$ – концентрация в супернатантах VII фактора свертывания, $x5$ – концентрация в супернатантах ргоBNP, $x6$ – сывороточная концентрация дефензинов, $x7$ – концентрация дефензинов в супернатантах. Для оценки разделительной (от

здоровых лиц) значимости данной математической модели, характеризующей белково-пептидный паттерн у больных ИБС, проведен ROC анализ (диаграмма 2). Данная модель по показателю AUC имеет отличные разделительные свойства.

Диаграмма 1

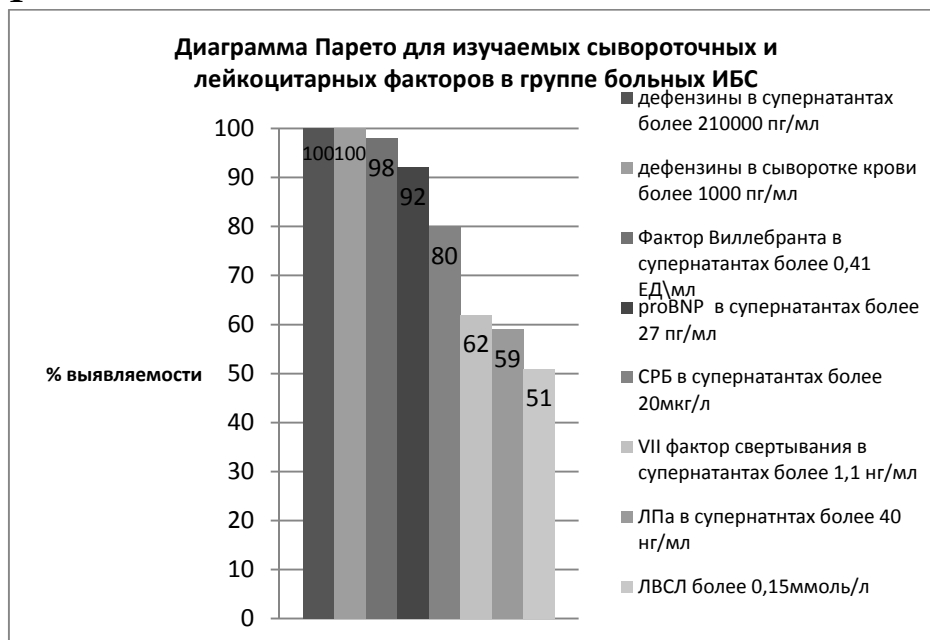
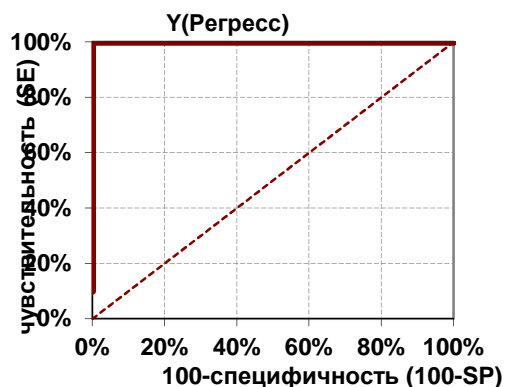


Диаграмма 2

ROC кривая, построенная по значению γ у больных ИБС



Анализ корреляции изучаемых показателей у больных ИБС показал, что величина ЛВСЛ имеет прямую умеренной силы связь с содержанием в сыворотке NT-proBNP ($R=0,32$, $p=0,04$), конечным диастолическим объемом левого желудочка (КДО ЛЖ) ($R=0,34$, $p=0,01$), средним давлением в легочной артерии ($R=0,46$, $p=0,02$), тяжестью структурно-функциональных изменений сердца ($R=0,31$, $p=0,03$), сильную прямую связь с наличием атеросклеротических бляшек в БЦА ($R=0,78$, $p=0,04$), а также выявлена отрицательного характера взаимосвязь с фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) ($R=-0,35$, $p=0,008$). Связь содержания в лейкоцитарных супернатантах СРБ и дефензинов ($R=0,37$, $p=0,04$), а также дефензинов-альфа и NT-proBNP ($R=0,4$, $p=0,03$) носила умеренной силы прямой характер. Была выявлена взаимосвязь между содержанием дефензинов альфа в сыворотке

кровии КДО ЛЖ ($R=0,57$, $p=0,01$), тяжестью ремоделирования сердца ($R=0,43$, $p=0,02$), а также сывороточной концентрацией ИЛ-6 ($R=0,47$, $p=0,009$). Содержание дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах было связано прямой связью с размерами левого предсердия (ЛП) ($R=0,8$, $p=0,03$), массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ) ($R=0,8$, $p=0,008$), концентрацией в супернатантах proBNP ($R=0,4$, $p=0,03$). Значение содержания в лейкоцитарных супернатантах ЛПА и КДО ЛЖ были связаны прямой связью умеренной силы ($R=0,43$, $p=0,02$). Содержание в супернатантах СРБ напрямую коррелировало с концентрацией в них дефензинов альфа ($R=0,37$, $p=0,04$) и линейным размером ЛП ($R=0,82$, $p=0,02$). Анализ корреляционных связей показал, что, чем выше содержание ИЛ-6, тем больше размер левого предсердия ($R=0,81$, $p=0,02$), тяжелее структурно-функциональное ремоделирование сердца ($R=0,32$, $p=0,03$) и ниже фракция выброса ЛЖ ($R=-0,44$, $p=0,03$).

Таким образом, на основании анализа научной литературы и собственных данных сформулирована концепция дезадаптации механизмов воспаления и врожденного иммунитета в рамках сердечно-сосудистого континуума у больных атеросклерозом. Эволюционная роль большинства из изученных нами белковых факторов состоит в уничтожении и отграничении чужеродного антигена. Так, дефензины-альфа и СРБ непосредственно связаны с системой противомикробного иммунитета, ЛПА с репаративной активностью и ангиогенезом, ФВ и VII фактор свертывания с тромботическими процессами, отграничивающими чужеродный очаг. Часть из этих белков синтезируются конституционально (ЛПА, VII фактор и др.), другие преимущественно индуцибельно (СРБ) и, наконец, концентрация ряда белков может определяться как конституциональным синтезом, так и индуцибельным (дефензины). Многие из этих факторов обладают атерогенной активностью. Исходя из этого, индивидуумы, получив эволюционно сформированный механизм защиты, «расплачиваются» активностью процессов атерогенеза. Процесс формирования атеросклеротических поражений следует рассматривать как измененную активность механизмов, связанных с эволюционно сформированной системой белкового синтеза лейкоцитами, в первую очередь нейтрофилов, выступающей как компонент ограничения и уничтожения чужеродных антигенов. У больных ИБС выявлено, что, в сравнении со здоровыми лицами, в сыворотке значимо выше концентрация СРБ, ЛПА, дефензинов, VII фактора свертывания, NT-proBNP, ФВ, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-альфа, а в супернатантах лейкоцитарных культур выше содержание дефензинов-альфа, СРБ, ЛПА, VII фактора свертывания, ФВ и NT-proBNP.

Выводы

1. Экспериментально установлено увеличение продукции предшественника мозгового натрийуретического пептида в культурах лейкоцитов (нейтрофилов) больных ишемической болезнью сердца с хронической сердечной недостаточностью.
2. У больных ИБС обнаружен паттерн биологически активных белков, характеризующийся высокой концентрацией в сыворотке С-реактивного белка, липопротеина (а), предшественника мозгового натрийуретического пептида, дефензинов альфа (1-3), интерлейкина 6 и фактора некроза опухоли альфа, а в лейкоцитарных супернатантах-дефензинов альфа 1-3, С-реактивного белка, липопротеина (а), предшественника мозгового натрийуретического пептида, VII фактора свертывания и фактора Виллебранда. Установлена связь липидвысвобождающей способности лейкоцитов и продукции ими дефензинов-альфа и мозговых натрийуретических пептидов, указывающая на синергизм этих процессов у больных ишемической болезнью сердца.
3. У больных ишемической болезнью сердца с хронической сердечной недостаточностью обнаружена корреляция между процессами субклинического воспаления, характеризуемыми величиной липидвысвобождающей способности лейкоцитов, содержанием в супернатантах лейкоцитарных культур дефензинов альфа (1-3), а в сыворотке крови С-реактивного белка и дефензинов альфа с процессами ремоделирования сердца (линейными размерами предсердий, типом ремоделирования) и тяжестью клинических проявлений, определяемых дистанцией, пройденной в тесте 6 минутной ходьбы с on-line мониторингом частоты сердечных сокращений.
4. Комплексная оценка белково-пептидного паттерна в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах с использованием методов математического моделирования позволяет улучшить эффективность дифференциальной диагностики.

Список литературы

1. Мишланов В.Ю. Способ диагностики функционального класса хронической сердечной недостаточности у больных стенокардией / В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова, Е.А. Челебаева // № 2462175 от 28.02.2011.
2. Мишланов В.Ю. Способ оценки белок синтезирующей функции лейкоцитов для клинических исследований / В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова // № 2530593 от 14.08.2014.
3. Оганов Р.Г. Профилактика сердечно-сосудистых и других неинфекционных заболеваний – основа улучшения демографической ситуации в России / Р.Г. Оганов, Г.Я. Масленникова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2005. – № 3. – С. 4-9.

4. Ferreira-González Ignacio. Epidemiology of Coronary Heart Disease / Ignacio Ferreira-González // Spanish Review of Cardiology. – 2014. – V. 67. – I. 2. – P. 139-144.
5. Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease / G. Hansson // N Engl J Med. – 2005. – V. 352. – P. 1685-1695.
6. Hartaigh G. Which leukocyte subsets predict cardiovascular mortality? From the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study Bríain/Hartaigh, Jos A. Bosch, G. Neil Thomas, Janet M. Lord, Stefan PИЛz, Adrian Loerbroks, Marcus E. Kleber, Tanja B. Grammer, Joachim E. Fischer, Bernhard O. Boehm, and Winfried März //Atherosclerosis. – 2012. – V. 224. – I. 1. – P. 161-169.
7. Libby P. Inflammation in atherosclerosis/P. Libby // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2012. – V. 32 (9). – P.2045-2051.
8. Weber C. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models /C. Weber, A. Zernecke, P. Libby // Nat Rev Immunol. – 2008. – V. 8. – P. 802-815.

Рецензенты:

Зиньковская Т.М., д.м.н., профессор кафедры терапии, семейной медицины ДПО ГБОУ ВПО «ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь;

Шаврин А.П., д.м.н., доцент кафедры терапии, семейной медицины ДПО ГБОУ ВПО «ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь.