

УДК 616.12-008.46: 615.254.1.03:612.017.1:616.155.194.8]-0.78.33

Уровень провоспалительных цитокинов, фактора Виллебранда, С-реактивного белка, метаболической активности нейтрофилов и антиоксидантной защиты плазмы крови у больных ишемической болезнью сердца, осложненной развитием сердечной недостаточности

А.Е. Кратнов, О.Е. Пивень, А.А. Кратнов, М.И. Румянцев, С.Л. Матыцин

Государственная медицинская академия, г. Ярославль, Россия

level of proinflammatory cytokines, Willebrand factor, C-reactive protein, metabolic activity of neutrophils and antioxidative protection of blood plasma at patients with ischemic heart disease complicated development of heart failure

A.E. Kratnov, O.E. Piven, A.A. Kratnov, M.I. Rumyancev, S.L. Matytsin

State Medical Academy, Yaroslavl, Russia

Аннотация

У 58 больных ишемической болезнью сердца, осложненной развитием сердечной недостаточности, изучались показатели интерлейкина-6, фактора некроза опухоли α , фактора фон Виллебранда, С-реактивного белка, метаболической активности нейтрофилов и антиоксидантной защиты плазмы крови. Увеличение тяжести класса, как острой, так и хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца, происходило на фоне роста показателей интерлейкина-6 и фактора фон Виллебранда. Выявленная активация хронического воспаления и усугубления эндотелиальной дисфункции сопровождалась ростом образования в нейтрофилах супероксидного анион-радикала и интенсификацией процесса свободнорадикального окисления липидов. Утяжеление класса острой сердечной недостаточности (III класс) также сопровождалось снижением потенциала антиоксидантной защиты плазмы крови (каталазы).

Ключевые слова

Цитокины, эндотелиальная дисфункция, нейтрофилы, антиоксиданты, сердечная недостаточность.

Известно, что развитие сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) является предиктором фатального исхода. Ежегодная смертность среди пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Summary

At 58 patients with ischemic heart disease complicated development of heart failure, parameters of interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, and von Willebrand factor, C-reactive protein, metabolic activity of neutrophils and antioxidative protection of blood plasma were studied. The increase in weight of class, both acute, and chronic heart failure at patients with ischemic heart disease, occurred on background of growth of parameters interleukin 6 and von Willebrand factor. The revealed activation of chronic inflammation and aggravation endothelial dysfunction was accompanied by growth of formation superoxide anion-radical in neutrophils and intensification of process lipid peroxidation. Weighting of class of acute heart failure (III class) also was accompanied by decrease potential antioxidative protection of blood plasma (catalase).

Key words

Cytokines, endothelial dysfunction, neutrophils, antioxidance, heart failure.

III-IV функциональных классов достигает 60% [1]. В последние годы основным механизмом развития и прогрессирования сердечной недостаточности считается нарушение регулирующей функции сосудистого эндотелия. Полага-

ется, что при длительном воздействии повреждающих факторов (воспаление, гемодинамическая перегрузка, интоксикация и др.) происходит не только истощение компенсаторной «дилатирующей» способности эндотелия, но и её «извращение», следствием которого является вазоконстрикция и пролиферация эндотелиальных клеток в ответ на обычные стимулы. Одним из потенциальных механизмов эндотелиальной дисфункции при сердечной недостаточности у больных ИБС считается увеличение выработки свободных радикалов кислорода, инактивирующих эндотелиальный фактор релаксации – оксид азота [2]. В тоже время показано, что главным продуцентом реактивных форм кислорода у больных ИБС являются нейтрофилы, активирующиеся при реперфузии и реоксигенации ишемического очага [3, 4].

Целью исследования явилось изучение показателей интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли б (TNF α), фактора фон Виллебранда (ФФВ), С-реактивного белка (С-РБ), метаболической активности нейтрофилов и антиоксидантной защиты плазмы крови у больных ИБС, осложненной развитием сердечной недостаточности.

Материалы и методы

В исследование было включено 58 больных ИБС, средний возраст которых составлял 62,5 \pm 10 лет. Среди обследованных пациентов 31 (53,4%) был с нестабильной стенокардией, 8

(13,8%) – с инфарктом миокарда без зубца Q (не-Q-инфарктом миокарда) и 19 (32,8%) – с инфарктом миокарда с зубцом Q (Q-инфарктом миокарда). С целью верификации диагноза инфаркта миокарда проводился качественный тест на определение тропонина Т в крови (тропонин Т ? 0,1 нг/мл). Острая сердечная недостаточность классифицировалась по Т. Killip. При поступлении в стационар она наблюдалась у 53 (91,4%) обследованных больных. I класс выявлялся у 35 (60,3%), II класс – у 12 (20,7%), III класс – у 5 (8,6%), IV класс – у 1 (1,8%) пациента. Хроническая сердечная недостаточность наблюдалась у 54 (93,1%) пациентов. Функциональный класс (ФК) хронической сердечной недостаточности определялся по классификации NYHA, для чего применялась проба с 6-минутной ходьбой. I ФК хронической сердечной недостаточности был диагностирован у 11 (19%), II ФК – у 25 (43,1%), III ФК – у 18 (31%) пациентов. Больные с IV ФК из исследования исключались (табл. 1).

Контрольную группу без клинически и инструментально подтвержденной ИБС составили 17 доноров (средний возраст 54,7 \pm 4,1 года).

IL-6 и TNF α определялись в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов ProCon IL-6 и TNF- α ООО “Протеиновый контур” (Россия, Санкт-Петербург). Определение в сыворотке крови концентрации ФФВ, увеличение концентрации

Таблица 1

Количество случаев острой и хронической сердечной недостаточности у обследованных больных

	Всего n = 58	Нестабильная стенокардия n = 31	Не-Q-инфаркт миокарда n = 8	Q-инфаркт миокарда n = 19
Острая сердечная недостаточность				
нет	5 (8,6)	5 (16,1)	0 (0)	0 (0)
I класс	35 (60,3)	19 (61,3)	4 (50)	12 (63,1)
II класс	12 (20,7)	6 (19,4)	3 (37,5)	3 (15,8)
III класс	5 (8,6)	0 (0)	1 (12,5)	4 (21,1)
IV класс	1 (1,8)	1 (3,2)	0 (0)	0 (0)
Хроническая сердечная недостаточность				
нет	4 (6,9)	3 (9,7)	0 (0)	1 (5,3)
I ФК	11 (19)	4 (12,9)	1 (12,5)	6 (31,5)
II ФК	25 (43,1)	14 (45,2)	3 (37,5)	8 (42,1)
III ФК	18 (31)	10 (32,2)	4 (50)	4 (21,1)

которого отражает генерализованную эндотелиальную дисфункцию [4], проводилось с помощью твердофазного иммуноферментного метода с использованием коммерческих реактивов фирмы DAKO (Дания) и международных стандартов (NIBSC, Англия). Концентрацию С-РБ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа по J. Highton и P. Hessian.

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной крови, взятой при поступлении больных в блок интенсивной терапии кардиологического отделения, в двойном градиенте плотности фикола-верографина 1,077 и 1,092 г/мл. Для изучения активности НАДФ-оксидазы нейтрофилов использовался тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), который проводили количественным спектрофотометрическим методом по Т.А. Gentle и R.A. Thompson (1990) с использованием 0,2% раствора нитросинего тетразолия и растворением восстановленного диформаза в смеси 2М калия гидроксида и диметилсульфоксида 3:5 по объему [5]. Уровень миелопероксидазы (МПО) в клетках оценивали количественным спектрофотометрическим методом с использованием 0,04% раствора орто-фенилендиамина на фосфатном буфере с рН 5,0 и добавлением 0,33% раствора перекиси водорода в соотношении 20:1 по объёму [6]. Активность глутатионредуктазы (ГР) в нейтрофилах определяли спектрофотометрическим методом по степени окисления НАДФ·Н [7]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) плазмы крови исследовали по методу М. Nishikimi и соавторов, вариант Н. Окамура и соавторов в модификации Г. И. Клебанова с соавторами (1990) в тесте торможения спонтанного восстановления НСТ с использованием в качестве реагент-субстратной смеси растворов НСТ, феназинметасульфата и восстановленного в-никотинамид-аденин-динуклеотида [8]. Определение активности каталазы в сыворотке крови основывалось на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Уровень малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови определяли непрямым методом, основанном на его способности взаимодействовать с тиобарбитуровой кислотой при высокой температуре и низкой рН, с образованием окрашенного комплекса [6]. Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли по методу A. Digean и В. Mayer в модификации В. Гашко-

вой и соавторов (1978), преципитацией в растворе полиэтиленгликоля при рН 8,4 [9].

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета программы Statistica 5.5. Сравнение дискретных величин осуществлялось с использованием критерия χ^2 Пирсона с коррекцией по Йетсу. 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

Количество случаев острой сердечной недостаточности III класса было больше у больных с Q-инфарктом миокарда, по сравнению с пациентами, у которых наблюдались нестабильная стенокардия ($p = 0,03$) и не-Q-инфаркт миокарда. У всех больных ИБС с признаками острой сердечной недостаточности при поступлении в стационар были достоверно выше по сравнению с контролем уровни П-6, ФФВ и МДА. По мере утяжеления класса острой сердечной недостаточности наблюдался постепенный рост уровней вышеуказанных показателей, а также уровня С-РБ, который был достоверно выше контроля у больных со II классом. При этом показатели ФФВ у больных с III классом острой сердечной недостаточности были достоверно выше по сравнению с показателями I ($p = 0,03$) и II класса ($p = 0,04$). У данных пациентов по сравнению с контролем ($p = 0,04$), а также с показателями больных с I ($p = 0,08$) и II классами ($p = 0,09$), был ниже контроля уровень каталазы в плазме крови. Более выраженная эндотелиальная дисфункция на фоне роста содержания в крови вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов и снижения уровня антиоксидантной защиты плазмы у больных с III классом острой сердечной недостаточности сопровождалась увеличением активности НАДФ-оксидазы нейтрофилов по данным НСТ-теста (табл. 2).

Достоверных различий по распределению ФК хронической сердечной недостаточности у больных с нестабильной стенокардией и инфарктом миокарда выявлено не было. У пациентов с наличием хронической, как и острой сердечной недостаточности, при поступлении в стационар были достоверно выше контрольных зна-

чений показатели IL-6, ФФВ и МДА. У больных с III ФК максимальный рост данных значений сопровождался достоверно более высокой активностью мембранной НАДФ-оксидазы в нейтрофилах (табл. 3). Между показателями МДА и ФФВ наблюдалась прямая корреляция у больных с острой ($r = 0,39$; $p = 0,005$) и хронической сердечной недостаточностью ($r = 0,74$; $p =$

$0,0005$). У пациентов с хронической сердечной недостаточностью также наблюдалась значительная прямая корреляция между значениями МДА и IL-6 ($r = 0,56$; $p = 0,02$).

Таким образом, у больных с признаками как острой, так и хронической сердечной недостаточности, при поступлении в стационар наблюдаются однонаправленные изменения в виде

Таблица 2

Цитохимические и биохимические показатели у обследованных больных в зависимости от класса острой сердечной недостаточности

Показатель	Контроль n = 17	I I класс n = 35	II II класс n = 12	III III класс n = 5
НСТ-тест, нмоль	105,7 ± 16,8	103 ± 22,5	104,7 ± 11,7	113,1 ± 19
МПО, SED	21 ± 11,3	15,2 ± 9,1	15,3 ± 9,5	12,6 ± 6,8
ГР, нмоль·л ⁻¹ ·сек ⁻¹	81 ± 107,4	39,4 ± 43,7	51,4 ± 55,5	38,9 ± 15,2
Каталаза, мкат/л	494,1 ± 229,7	507,6 ± 295,5	414,4 ± 175,3	302,8 ± 69,9*
СОД, SED/мл	2,4 ± 1	2,1 ± 1,2	2,3 ± 1,3	2,6 ± 1,5
С-РБ, мг/л	5,8 ± 3,1	27,4 ± 41,1	44,8 ± 54,8*	50 ± 86,6
IL-6, пг/мл	7,6 ± 1,5	38,2 ± 23,7*	71,4 ± 83,7* ^	68,4 ± 67,3* ^^
TNFα, пг/мл	32,3 ± 4,5	43,9 ± 81,7*	47,9 ± 113,8	59,7 ± 92,2
ФФВ, МЕ/мл	1,0 ± 0,1	2,8 ± 1,1	2,6 ± 1,1	4 ± 1,6* ^^ ^^
ЦИК, ед. опт. пл.	46,9 ± 29,8	64,8 ± 45,8	87 ± 75,9	58,4 ± 59,8
МДА, мкмоль/л	39 ± 5,7	64,7 ± 20,1*	70,9 ± 24,2*	82,7 ± 27,9*

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ^ – между I и II; ^^ – между I и III; ^^ – между II и III группами.

Таблица 3

Цитохимические и биохимические показатели у обследованных больных в зависимости от функционального класса хронической сердечной недостаточности

Показатель	Контроль n = 17	I I ФК n = 11	II II ФК n = 25	III III ФК n = 18
НСТ-тест, нмоль	105,7 ± 16,8	91,7 ± 26,7	108,4 ± 19,4^	104,8 ± 12,4^^
МПО, SED	21 ± 11,3	16,1 ± 6,6	16,2 ± 10,3	12,1 ± 7,1*
ГР, нмоль·л ⁻¹ ·сек ⁻¹	81 ± 107,4	34,5 ± 19,5	47,6 ± 53,4	40,9 ± 39,5
Каталаза, мкат/л	494,1 ± 229,7	559,3 ± 315	449,8 ± 270,7	448,1 ± 242,6
СОД, SED/мл	2,4 ± 1	2,3 ± 1	2,1 ± 1,2	2,3 ± 1,4
С-РБ, мг/л	5,8 ± 3,1	20,3 ± 42,9	39,3 ± 50,9	26,5 ± 46,7
IL-6, пг/мл	7,6 ± 1,5	42,2 ± 23,6*	33,4 ± 24,7*	67,6 ± 71,8* ^^
TNFα, пг/мл	32,3 ± 4,5	47,7 ± 68,6	71,4 ± 118,7	15,2 ± 20,8
ФФВ, МЕ/мл	1,0 ± 0,1	2,6 ± 0,7*	2,8 ± 1,2* ^	3,2 ± 1,5* ^^
ЦИК, ед. опт. пл.	46,9 ± 29,8	62,6 ± 51,9	58,1 ± 42,6	75,7 ± 71,4
МДА, мкмоль/л	39 ± 5,7	68,9 ± 22*	60,3 ± 19,4*	77,6 ± 23,6* ^^ ^^

развития генерализованной эндотелиальной дисфункции на фоне активации хронического воспаления (увеличение уровня ИЛ-6) и процесса свободнорадикального окисления липидов, повышения образования в нейтрофилах супероксидного анион-радикала. У больных с выраженными проявлениями острой сердечной недостаточности (III класс) кроме того, наблюдалось снижение антиоксидантной защиты плазмы крови (каталазы).

В последние годы центральное место в патогенезе атеротромбоза, наиболее распространенной гипотезой развития которого является «реакция на повреждение», отводится эндотелиальной дисфункции. Одним из ранних проявлений дисфункции эндотелия считается появление специфических молекул адгезии на поверхности эпителиальных клеток, к которым прикрепляются моноциты и Т-лимфоциты. Проникающие в субэндотелиальное пространство, лейкоциты присутствуют в артериальной стенке на всех стадиях атеротромбоза, что свидетельствует о наличии слабовыраженного воспаления [10]. Поэтому полагается, что маркеры, отражающие слабовыраженную воспалительную реакцию и эндотелиальную дисфункцию, могут иметь значение для стратификации риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Одними из показателей хронического вялотекущего воспаления, подробно изученных у больных ИБС, осложненной сердечной недостаточностью, являются провоспалительные цитокины ИЛ-6 и TNF α . Однако точные данные о механизмах активации кардиопатогенных цитокинов у данных пациентов отсутствуют. Полагается, что причинами их усиленной выработки является гиперактивация симпатико-адреналовой и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем, а также состояние хронической гипоксии [11]. Увеличение выработки провоспалительных цитокинов может быть связано, в том числе и с активацией фагоцитов. Показано, что при введении адреналина количество циркулирующих нейтрофилов увеличивается за счёт перехода в циркуляцию части пристеночных клеток маргинального пула [12]. Также под влиянием катехоламинов реципрокно усиливается рекрутирование нейтрофилов в лёгкие, в которых, как было доказано А. Коганом и соавт. [13], у карди-

ологических больных происходит нарастание способности гранулоцитов продуцировать активные формы кислорода.

Результаты настоящего исследования совпадают с данными, полученными М.Ю. Ситниковой и соавт. [12], которые установили связь роста ФФВ с ФК хронической сердечной недостаточности, утяжеление которого сопровождалось ростом циркулирующих десквамированных эндотелиальных клеток в крови, что свидетельствует о возрастающем повреждении эндотелия под действием цитокиновой и нейрогуморальной активации. Полагается, что у больных с хронической сердечной недостаточностью рост образования цитокинов (интерлейкин-8) приводит к активации хемотаксиса нейтрофилов, продукции молекул адгезии, осуществляющих взаимодействие клеток с эндотелием, выработку фагоцитами других провоспалительных цитокинов. Последующее повреждение нейтрофилами эндотелия стимулирует выработку им хемокина интерлейкина-8, что замыкает порочный круг. Поскольку в регуляции фермента НАДФ-оксидазы, отвечающего за образование кислородных радикалов в фагоцитах, участвуют цитокины, существует связь между активацией хронического вялотекущего воспаления, генерализованной эндотелиальной дисфункцией и повышенным образованием активных форм кислорода нейтрофилами у больных с наличием сердечной недостаточности [15, 16]. Это косвенно подтверждается плеiotропными эффектами статинов, которые наряду с улучшением функции эндотелия и снижением активности маркеров воспаления, оказывают и антиоксидантный эффект у больных ИБС [17].

Заключение

Увеличение тяжести класса, как острой, так и хронической сердечной недостаточности у больных ИБС, происходящее на фоне активации хронического воспаления и усугубления эндотелиальной дисфункции сопровождается ростом образования в нейтрофилах супероксидного анион-радикала и активацией процесса свободнорадикального окисления липидов. Утяжеление класса острой сердечной недостаточности (III класс) кроме того, сопровождается снижением потенциала антиоксидантной защиты плазмы крови (каталазы).

Литература

1. Фомин И.В., Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю. и соавт. Распространенность ХСН в Европейской части Российской Федерации – данные ЭПОХА-ХСН. Журнал Сердечная недостаточность 2006; 1: 4-7.
2. Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю., Агеев Ф.Т. Эндотелиальная дисфункция при сердечной недостаточности: возможности терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента. Кардиология 2001; 5: 100-104.
3. Маянский Д.Н., Маянская С.Д. Роль нейтрофилов в ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда. Тер. архив 2001; 12: 84-88.
4. Lip G.Y., Blann A. A von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? Cardiovasc Res 1997; 34: 255-265.
5. Gentle T.A., Thompson R.A. Neutrophil function tests in clinical immunology. Clinical Immunology. A practical approach. Gooi H.G., Chapel H. (eds.). Oxford University Press. New York. 1990: 57-59.
6. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб: ИКФ Фолиант; 2000.
7. Кратнов А.Е., Потапов П.П., Власова А.В. и соавт. Активность глутатионредуктазы в нейтрофилах у больных муковисцидозом. Клиническая лабораторная диагностика 2005; 2: 33-37.
8. Клебанов Г.И., Крайнина М.В., Чукаева И.И. Изменение активности супероксиддисмутазы в процессе стимуляции полиморфноядерных лейкоцитов. Бюлл. экспер. биологии и медицины 1990; 4: 334-336.
9. Гашкова В., Матл И., Кашлик И. Циркулирующие комплексы у больных иммунокомплексными заболеваниями и после трансплантации почек. Чех. Мед. 1978; 2: 117-122.
10. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 1999; 340: 115-126.
11. Ольбинская Л.И., Сизова Ж.М., Игнатенко С.Б. Нарушения в системе цитокинов у больных ХСН и возможности их коррекции с помощью в-адреноблокаторов. Журнал Сердечная недостаточность 2006; 3: 116-120.
12. Серов В.В., Пауков В.С. Воспаление. М: Медицина; 1995.
13. Коган А. Усиление генерации активных форм кислорода лейкоцитами в лёгких. Врач 1995; 11:30-31.
14. Ситникова М.Ю., Максимова Т.А., Вахрамеева Н.В. и соавт. Состояние эндотелия и маркеры хронического воспаления у больных ИБС, осложненной сердечной недостаточностью. Журнал Сердечная недостаточность 2002; 2: 80-82.
15. Braily G., Dorleans-Juste P. Cytokine – induced free radicals and their roles in myocardial dysfunction. Cardiovasc. Res. 1999; 3: 576-577.
16. Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 2000; 86: 494-501.
17. Васюк Ю.А., Атрощенко Е.С., Ющук Е.Н. Плейотропные эффекты статинов – данные фундаментальных исследований. Сердце 2006; 5: 228-237.