

УДК 616.12-005.4-092

Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов и антиоксидантная защита у больных со смертельным исходом инсульта и ишемической болезни сердца

А.Е. Кратнов, М.И. Румянцев, О.Е. Пивень, А.А. Кратнов, Н.П. Петрова

Государственная медицинская академия, г. Ярославль, Россия

Redox regulation metabolism of neutrophils and antioxidative protection at patients with fatal outcome of insult and ischemic heart disease

A.E. Kratnov, M.I. Rumyancev, O.E. Piven, A.A. Kratnov, N.P. Petrova

State Medical Academy, Yaroslavl, Russia

Аннотация

У 170 больных с инсультом и ишемической болезнью сердца изучался кислородзависимый метаболизм нейтрофилов и антиоксидантная защита в зависимости от исхода в течение года наблюдения с момента поступления в стационар. У пациентов, которые умерли в течение периода наблюдения, при поступлении в стационар определялась достоверно более высокая активность НАДФ-оксидазы нейтрофилов, которая сопровождалась снижением активности глутатионредуктазы в клетках и увеличением содержания в крови вторичных продуктов перекисного окисления липидов. Активация окислительного стресса у данных больных наблюдалась на фоне более низкого уровня холестерина в крови.

Ключевые слова

Нейтрофилы, продукция активных форм кислорода, инсульт, ишемическая болезнь сердца, смерть.

Инсульт и ишемическая болезнь сердца (ИБС), основной причиной которых является атеротромбоз, по данным Всемирной организации здравоохранения остаются ведущими причинами смерти в индустриально-развитых странах мира [1]. Большое внимание в последние годы уделяется изучению генерализованного воспаления при атеротромбозе [2]. Доказано, что одним из проявлений данного воспаления является окислительный стресс, развитие

Summary

At 170 patients with stroke and ischemic heart disease it was studied redox regulation of neutrophils and antioxidative protection depending on outcome within one year of supervision from the moment of receipt in hospital. At patients who have died during the period of supervision, at receipt in hospital higher activity NADP-oxidase of neutrophils which was accompanied by decrease in activity of glutathione reductase in cells and increase contents by-products of lipid peroxidation in blood was defined authentically. Activation of oxidative stress at the given patients was observed on background of lower level of cholesterol in blood.

Keywords

Neutrophils, free radical production, stroke, ischemic heart disease, death.

которого связано, в том числе с активацией кислородзависимого метаболизма нейтрофилов при реперфузии и реоксигенации ишемического очага [3, 4].

Цель исследования – изучение кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и антиоксидантной защиты у больных с инсультом и ишемической болезнью сердца, у которых в течение года наблюдения с момента поступления в стационар наступил смертельный исход.

Материалы и методы

Всего обследовано 170 больных. С инсультом наблюдалось 70 (41,2%) пациентов, из них – 50 (71,4%) с ишемическим и 20 (28,6%) с геморрагическим. Среди больных ИБС в количестве 100 (58,8%) человек обследовано: 54 – с нестабильной стенокардией, 11 – с не-Q-инфарктом миокарда и 35 – с Q-инфарктом миокарда. Средний возраст обследованных пациентов составлял $62,3 \pm 8,8$ года. Наблюдение за больными продолжалось в течение 12 месяцев с момента включения в исследование. За время наблюдения умерли от сердечно-сосудистых причин 18 (10,5%) больных, из них 11 с инсультом и 7 с ИБС. Умершие больные были недостоверно старше по возрасту оставшихся в живых пациентов ($64,3 \pm 8,4 > 62,1 \pm 8,8$ года; $p = 0,30$). Контрольную группу без клинически и инструментально подтверждённой ИБС составили 17 доноров (средний возраст $54,7 \pm 4,1$ года).

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной крови, взятой при поступлении больных в стационар, в двойном градиенте плотности фиколла-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 объёму [5]. Уровень миелопероксидазы 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 в нейтрофилах определяли спектрофотометрическим методом по степени окисления НАДФ·Н [7]. Определение активности каталазы в сыворотке крови основывалось на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Уровень малонового диальдегида в сыворотке крови определяли прямым методом, основанном на его способности взаимодействовать с тиобарбиту-

ровой кислотой при высокой температуре и низкой рН, с образованием окрашенного комплекса [6]. Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли по методу A.Digean и В.Мауег в модификации В. Гашковой и соавторов (1978), преципитацией в растворе полиэтиленгликоля при рН 8,4 [8]. Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрических и непараметрических методов, используя пакет Statistica 5.5. 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 больных с инсультом, умерших в течение года наблюдения, было недостоверно больше, чем с ИБС ($61,1\% > 38,9\%$; $p = 0,11$). Изучение показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и антиоксидантной защиты показало (табл. 1), что у больных с инсультом при поступлении в стационар были выше показатели НСТ-теста ($p = 0,002$), ниже активность миелопероксидазы ($p = 0,01$) и глутатионредуктазы ($p = 0,0006$) в клетках, а также уровень ЦИК ($p = 0,0002$). Это свидетельствует о более выраженной активации НАДФ-оксидазы нейтрофилов и истощении антиоксидантной защиты в клетках у больных с инсультом. Активация окислительного стресса при инсульте, по сравнению с больными ИБС, сопровождалась достоверно более низким уровнем в крови холестерина ($195,1 \pm 40,8 < 257,9 \pm 75,5$ мг/дл; $p = 0,00002$).

При поступлении в стационар у обследованных больных, умерших в течение года наблюдения, по сравнению с контролем ($p = 0,02$) и показателями пациентов, оставшихся в живых ($p = 0,003$), также наблюдались достоверно более высокие значения НСТ-теста. Рост образования в нейтрофилах супероксидного анион-радикала сопровождался снижением в них активности глутатионредуктазы и достоверным увеличением ($p = 0,001$) содержания в крови вторичных продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (табл. 2). Рост активности НАДФ-оксидазы нейтрофилов и истощение их антиоксидантной защиты наблюдалась на фоне более низкого, как и у больных с инсультом, содержания в крови холе-

стераина ($209,3 \pm 58 < 234,8 \pm 71,6$ мг/дл; $p = 0,06$). У пациентов со смертельным исходом выявлялась прямая корреляция между показателями НСТ-теста и малонового диальдегида ($r = 0,82$; $p = 0,02$), а также обратная с уровнем холестерина ($r = -0,90$; $p = 0,03$).

На сегодняшний день установлено, что существенную роль в патогенезе атеросклероза, который рассматривается как хронический воспалительный процесс, играет свободнорадикальное окисление [9, 10]. Одним из основных источников реактивных форм кислорода являются нейтрофилы, которые способны инфильтрировать пораженные атеросклерозом стенки сосудов и активность которых увеличивается при реперфузии ишемического очага. По-

лагается, что выработка кислородных радикалов в фагоцитах связана с комплексом флавоэнзима, содержащим фермент НАДФ-оксидазу, в регуляции которой участвуют провоспалительные цитокины (TNF α) и гормоны (ангиотензин II) [3, 11]. Снижение активности антиоксидантной защиты на фоне повышенной выработки активных форм кислорода в условиях ишемии/реперфузии создает условия для развития окислительного стресса [12, 13]. Одним из важных его последствий является гибель клеток. При этом свободные радикалы кислорода могут не только нарушать целостность клеточной мембраны, изменяя структуру фосфолипидов и белков, но и выступать в качестве сигнальных молекул

Таблица 1
Цитохимические и биохимические показатели у больных с инсультом и ИБС.

Показатель	Контроль n = 17	I ИБС n = 100	II Инсульт n = 70
НСТ-тест, нмоль восст. НСТ	105,7 \pm 16,8	102,7 \pm 24	123,5 \pm 59,4**
Миелопероксидаза, SED	21 \pm 11,3	15,7 \pm 8,7	12,5 \pm 7,7* **
Глутатионредуктаза, нмоль·л ⁻¹ ·сек ⁻¹	81 \pm 107,4	39,1 \pm 38,9*	29,1 \pm 45,5**
Каталаза, мкат/л	494,1 \pm 229,7	475 \pm 264,1	703,6 \pm 303*
ЦИК, ед. опт. пл.	46,9 \pm 29,8	73,2 \pm 66,5	37 \pm 36,6**
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	39 \pm 5,7	65,6 \pm 22,1*	75,2 \pm 34,4*

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** – между I и II группами; восст. – восстановленного

Таблица 2
Цитохимические и биохимические показатели у обследованных больных в зависимости от исхода в течение года наблюдения

Показатель	Контроль n = 17	I Остались живы n = 152	II Умерли n = 18
НСТ-тест, нмоль восст. НСТ	105,7 \pm 16,8	107,7 \pm 41,6	139,8 \pm 44,6* **
Миелопероксидаза, SED	21 \pm 11,3	14,4 \pm 8,5	14,8 \pm 9
Глутатионредуктаза, нмоль·л ⁻¹ ·сек ⁻¹	81 \pm 107,4	38,9 \pm 40,6*	24,3 \pm 23*
Каталаза, мкат/л	494,1 \pm 229,7	553,1 \pm 300,5	610,9 \pm 292,2
ЦИК, ед. опт. пл.	46,9 \pm 29,8	58,7 \pm 59,3	53,9 \pm 55
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	39 \pm 5,7	62,9 \pm 20,1*	90,7 \pm 24* **

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** – между I и II группами; восст. – восстановленного

(вторичных мессенджеров) и активаторов факторов транскрипции апоптоза или некроза [14]. Коагуляционному некрозу при окислительном стрессе подвергаются не только кардиомиоциты и нейроны, но и нейтрофилы, гибель которых зависит от содержания в клетке наиболее реакционноспособного гидроксил-радикала [15]. Повышенное образование данного радикала приводит к накоплению в клетке первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов (малонового диальдегида), играющих важную роль в повреждении молекул биополимеров клеточной мембраны. В этих условиях исключительное значение приобретает третья линия антиоксидантной защиты клетки, представленная глутатионзависимыми ферментами, которые катализируют реакции восстановления липопероксидов в биомембранах [16]. В данном исследовании активация НАДФ-оксидазы в нейтрофилах на фоне роста малонового диальдегида у обследованных больных, которые умерли в течение года наблюдения, сопровождалась выраженным снижением активности в клетках глутатионредуктазы, участвующей в биогенерации окисленного глутатиона. Можно полагать, что у данных

пациентов окислительный стресс является отражением массивной гибели нейтрофилов, которая могла в итоге привести к смерти целого организма [17]. Выявленный в настоящей работе более низкий уровень холестерина у больных с наступившей смертью наблюдался и в других исследованиях, где его уменьшение сопровождалось ростом уровня провоспалительных цитокинов [18, 19]. Поскольку не исключается, что полученный извне холестерин может использоваться для синтеза поврежденных клеточных мембран, его снижение может быть обусловлено окислительным стрессом, что подтверждает наличие обратной корреляции между показателями холестерина и НСТ-тестом с нейтрофилами [20].

Заключение

У больных с инсультом и ИБС, которые умерли в течение года от сердечно-сосудистых причин, при поступлении в стационар наблюдается рост производства супероксидного аниона-радикала нейтрофилами на фоне истощения антиоксидантной защиты в клетках (глутатионредуктазы) и увеличения содержания в крови вторичных продуктов перекисного окисления липидов.

Литература

1. World Health Organization. The World Health Report: conquering, suffering. Enriching humanity. Geneva: World Health Organization, 1997.
2. Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., Tracy R.P., Hennekens C.H. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Eng. J. Med.* 1997; 336: 973-979.
3. Маянский Д.Н., Маянская С.Д. Роль нейтрофилов в ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда. *Тер. архив* 2001; 12: 84-88.
4. Hall E.D., Andrus P.K., Althaus J.S., von Voiglander P.E. Hydroxyd radicals production and lipid peroxidation parallels selective post-ischemic vulnerability in gerbil brain. *J. Neuroch. Res.* 1993; 34: 107-112.
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., Углов Е.С., Сухоруков В.С. Активность глутатионредуктазы в нейтрофилах у больных муковисцидозом. *Клиническая лабораторная диагностика* 2005; 2: 33-37.
8. Гашкова В., Матл И., Кашлик И. Циркулирующие комплексы у больных иммунокомплексными заболеваниями и после трансплантации почек. *Чех. Мед.* 1978; 2: 117-122.
9. Casscells W., Hathorn B., David M., Krabach T., Vaughn W.K., McAllister H.A. et al. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implication for rupture and thrombosis. *Lancet* 1996; 347: 1447-1449.
10. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 45-47.
11. Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.
12. Haramaki N, Stewart DB, Aggarwal S, Ikeda H, Reznick AZ, Packer L. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by Ischemia-reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 25: 329-339.
13. Yoshida S., Abe K., Busto R. Watson B.D., Kogure K., Ginsberg M.D. Influence of transient ischemia on lipidesoluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolism in rat brain. *Brain Res.* 1982; 245: 307-316.

14. Alien R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 463-499.
15. Kasahara Y, Lwai K, Yachie A., Ohta, K., Konno A., Seki H. et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* 1997; 89: 1748-1753.
16. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. *Кардиология* 2000; 7: 48-61.
17. Скулачев В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма. *Биохимия* 1999; 64: 1679-1688.
18. Rauchhaus M., Koloczek V., Volk H.D., Kemp M., Niebauer J., Francis D.P. et al. Inflammatory cytokines and the possible immunological role for lipoproteins in chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2000; 76: 125-133.
19. Vredevoe D.L., Woo M.A., Doering L.V., Brecht M.L., Hamilton M.A., Fonarow G.C. Skin test anergy in advanced heart failure secondary to either ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 1998; 82: 323-328.
20. Доценко Э.А., Юпатов Г.И., Чиркин А.А. Холестерин и липопротеины низкой плотности как эндогенные иммуномодуляторы. *Имунопатология, аллергол., инфектол.* 2001; 3: 6-15.