

УДК 616-002-008.953-092

**ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАЗВИТИИ ДИСФУНКЦИИ МИОКАРДА У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ И СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ**

**Ильин М.В., Мальцева П.А., Волкова А.С., Романов В.А., Хрусталеv О.А.**

*ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ», Ярославль, e-mail: dissovet@yuma.ac.ru*

Проведено исследование показателей окислительного стресса и апоптоза нейтрофилов у 50 больных системной красной волчанкой и 32 больных системной склеродермией с наличием нарушения сократительной способности миокарда. Функциональную активность нейтрофилов исследовали хемилуминесцентным методом, для определения экспрессии антигена bak на поверхности нейтрофилов использовали стрептавидин-биотиновый метод. Установлено, что при наличии дисфункции миокарда у больных системной красной волчанкой выявляется повышение резерва продукции супероксид-аниона нейтрофилами. У больных системной склеродермией с наличием дисфункции миокарда наблюдается увеличение резерва образования активных форм кислорода, а также снижение экспрессии проапоптозного белка bak нейтрофилами.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, окислительный стресс, апоптоз, дисфункция миокарда

**THE EXPRESSION OF FACTORS OF OXIDATIVE STRESS AND APOPTOSIS OF NEUTROPHILS AT THE DEVELOPMENT OF MYOCARDIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND SYSTEMIC SCLEROSIS**

**Ilyin M.V, Maltseva P.A., Volkova A.S., Romanov V.A., Khrustalev O.A.**

*Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, , e-mail: dissovet@yuma.ac.ru*

We investigated the level of oxidative stress and apoptosis of neutrophils in 50 patients with systemic lupus erythematosus and 32 patients systemic sclerosis at the development of myocardial dysfunction. The functional activity of neutrophils was quantified by chemiluminescence. The expression of protein bak was estimated using streptavidine-biotin method. We found the increase of the reserve of superoxide anion production by neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus and myocardial dysfunction. In patients with systemic sclerosis and myocardial dysfunction we observed the increase of reserve potential and the decrease of expression of bak protein by neutrophils.

**Keywords:** neutrophils, oxidative stress, apoptosis, myocardial dysfunction

В последние годы наблюдается увеличение числа работ, свидетельствующих об участии клеточных и молекулярных механизмов аутоиммунитета в развитии хронической сердечной недостаточности (ХСН). Установлено, что аутоантитела оказывают прямое воздействие на клетки миокарда, приводя к повреждению сигнальных путей передачи импульсов или способствуя активации системы комплемента, в то время как механизмы, опосредованные Т-клетками, реализуются в результате прямой агрессии цитотоксических Т-лимфоцитов, либо опосредуются непрямыми эффектами провоспалительных цитокинов, продуцируемых стимулированными Т-клетками или макрофагами [4]. Приводятся данные о том, что в патогенезе аутоиммунного повреждения миокарда участвуют антимиозиновые антитела, антитела к M2-мускариновым рецепторам и антитела к белку теплового шока [2]. Предложена оригинальная концепция развития дисфункции миокарда при системных заболеваниях, объединившая аутоиммунные и гемодинамические механизмы патогенеза ХСН с участием цитокинов,

катехоламинов, ангиотензина II, альдостерона [3].

Целью настоящего исследования является изучение экспрессии факторов окислительного стресса и апоптоза нейтрофилов при развитии хронической сердечной недостаточности у больных системной красной волчанкой (СКВ) и системной склеродермией (ССД).

**Материал и методы исследования**

В исследование были включены 50 больных системной красной волчанкой, в возрасте от 18 до 73 лет (в среднем  $39,9 \pm 11,3$  года), и 32 пациента с системной склеродермией в возрасте от 18 до 72 лет (в среднем  $45,5 \pm 16,2$  года). Принимая во внимание, что в группу больных СКВ были рандомизированы только женщины, для обеспечения корректности статистического анализа контрольную группу СКВ составили 11 женщин. В группу контроля ССД были включены 25 относительно здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с контингентом данной группы.

Диагноз СКВ устанавливали на основании клинических проявлений заболевания, данных лабораторных, инструментальных методов исследования и классификационных критериев Американской ассоциации ревматологов (1982). Для верификации

диагноза ССД использовали критерии Американской ревматологической ассоциации (1980).

Показатели внутрисердечной гемодинамики оценивались ультразвуковым методом по стандартной методике, рекомендованной Американской ассоциацией эхокардиографии. Систолическая функция левых отделов сердца оценивалась с использованием показателей конечного систолического объема, ударного объема, фракции выброса левого желудочка. Диастолическая функция левого желудочка исследовалась путем регистрации трансмитрального доплеровского кровотока. Оценивались время изоволюмического расслабления и время замедления раннего диастолического наполнения левого желудочка.

Выделение нейтрофилов периферической крови проводили на двойном градиенте плотности фикола-урографина. Функциональную активность (ФА) клеток исследовали хемилюминесцентным методом. Для усиления хемилюминесценции (ХЛ) использовали люминол (ЛЛ), а также люцигенин (ЛН), который является селективным индикатором супероксид-аниона. О функциональном резерве клеток судили по коэффициентам активации хемилюминесценции (КА ХЛлл и КА ХЛлн), которые рассчитывали как отношение индуцированного показателя (иХЛлл и иХЛлн) к спонтанному (сХЛлл и сХЛлн). В качестве индуктора кислородзависимого метаболизма нейтрофилов использовали  $1 \cdot 10^9$  взвесь убитых нагреванием клеток *S. aureus* штамма p-209.

Для определения экспрессии проапоптозного антигена bak на поверхности нейтрофилов использовали стрептавидин-биотиновый метод (реагенты «ДАКОС cytometry», Дания). Исследование проводили в соответствии со стандартным протоколом, учитывая процент bak-положительных клеток. Использовали моноклональные мышечные антитела к гранулоцит-ассоциированному антигену CD15 для положительного контроля и разводящую жидкость для антител в качестве отрицательного контроля.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Осуществлялась проверка нормальности распределения количественных признаков. Для количественных признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, производилось вычисление медиан и интерквартильных интервалов (Me (25; 75%). Для сравнения двух независимых групп по одному признаку применяли критерий Манна-Уитни. Для изучения взаимосвязи двух признаков использовался корреляционный анализ по Спирмену. При установлении референтного интервала для количественных признаков использовалось процентильное определение нормы, основанное на измерениях, предпринятых на здоровой популяции. Критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 5%.

### Результаты исследования и их обсуждение

Наиболее вероятной причиной повреждения миокарда у больных СКВ являются иммуновоспалительные реакции, сопровождаемые повышением уровня цитокинов, которые продуцируются нейтрофилами, активированными лимфоцитами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Влияние цитокинов на прогрессирование

сердечной недостаточности, связанной с развитием дисфункции миокарда, реализуется путем их прямого повреждающего действия на кардиомиоциты [1].

У большинства больных, включенных в настоящее исследование, наблюдалась диастолическая дисфункция с сохраненной систолической функцией миокарда. Разделение больных СКВ на группы в зависимости от наличия или отсутствия нарушений сократительной способности левого желудочка сердца (ЛЖ) выявило увеличение резерва продукции супероксид-аниона нейтрофилами у больных СКВ с наличием дисфункции миокарда, по данным КА ХЛлн ( $0,67 (0,13; 1,5) > 0,48 (0,25; 1,15); p < 0,05$ ), по сравнению с пациентами, у которых сократительная способность миокарда была сохранена. При наличии систолической дисфункции миокарда наблюдалось статистически значимое снижение резервного потенциала нейтрофилов, по данным иХЛлл ( $0,35 (0,1; 1,0) < 1,1 (1,0; 6,4); p < 0,01$ ). Результаты исследования показателей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в зависимости от функционального класса (ФК) ХСН свидетельствуют о том, что при его увеличении регистрируется последовательное статистически значимое увеличение показателя продукции супероксид-аниона нейтрофилами ( $0,9 (0,3; 1,6) < 1,2 (0,5; 2,0) < 2,6 (2,0; 3,0); p < 0,05$ ).

Фиброз является характерным патоморфологическим признаком склеродермического поражения сердца и причиной развития систолической и диастолической дисфункции миокарда, сопровождающейся прогрессированием ХСН, которая отличается рефрактерностью к терапии и служит предиктором неблагоприятного исхода заболевания. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что нарушение сократительной способности миокарда у больных ССД ассоциировано со значительным увеличением показателей резерва продукции активных форм кислорода и апоптоза нейтрофилов. Установлено, что в группе больных ССД, имеющих дисфункцию миокарда, по сравнению с группой пациентов с сохраненной функциональной способностью миокарда и группой контроля, наблюдается увеличение резерва образования активных метаболитов кислорода, по данным КА ХЛлл ( $3,15 (1,2; 10,4) > 1,0 (0,62; 2,5); p < 0,05$ ) и ( $3,15 (1,2; 10,4) > 1,1 (0,7; 1,83); p < 0,05$ ), а также снижение экспрессии проапоптозного белка bak нейтрофилами ( $10,9 (8,5; 18,8) < 15,2 (11,3; 17,56); p < 0,05$ ) и ( $10,9 (8,5; 18,8) < 17,6 (16,7; 18,6); p < 0,05$ ).

Показатели биоцидности и апоптоза нейтрофилов у больных ССД имеют вариабельность в зависимости от характера дисфункции миокарда. При наличии систолической дисфункции миокарда у больных ССД отмечается более высокий уровень кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, по данным сХЛлл (3,0 (0,1; 5,1) > 1,2 (0,5; 5,2);  $p > 0,05$ ) и сХЛлн (2,2 (0,1; 3,0) > 0,9 (0,3; 2,0);  $p > 0,05$ ), и увеличение резерва образования свободных радикалов кислорода, по данным иХЛлл (6,0 (1,7; 9,0) > 2,8 (0,5; 9,0);  $p > 0,05$ ). При наличии диастолической дисфункции миокарда изучаемые показатели сопоставимы с показателями группы контроля и не отличаются от них статистически значимо. При наличии диастолической дисфункции миокарда левого желудочка наблюдается уменьшение количества нейтрофилов, склонных к апоптозу, в то время как при развитии систолической дисфункции миокарда регистрируется значимое увеличение числа клеток, экспрессирующих факторы апоптоза (11,7 (8,9; 16,3) < 19,5 (17,2; 19,7);  $p = 0,034$ ).

В группе больных ССД с ФК I ХСН наблюдалось значительное снижение интенсивности кислородзависимых реакций, по данным сХЛлл, по сравнению с группой больных с ФК II ХСН (0,65 (0,4; 1,7) < 4,7 (1,95; 13,3);  $p = 0,04$ ), в которой данный показатель был наиболее высоким, статистически значимо отличавшимся от показателя группы контроля (4,7 (1,95; 13,3) > 1,15 (0,5; 1,8);  $p < 0,05$ ). Нейтрофилы, выделенные у больных с ФК III ХСН, обладали значительным резервным потенциалом синтеза гидроперекисей, по данным иХЛлл, превосходившим резервные возможности нейтрофилов у больных с ФК I ХСН (6,5 (2,0; 12,0) > 0,6 (0,3; 3,9);  $p = 0,03$ ). В отличие от группы больных ССД с ФК II ХСН при ФК I ХСН наблюдалось статистически значимое снижение резерва продукции супероксид-аниона (0,1 (0,1; 0,35) < 1,0 (0,7; 2,1);  $p = 0,02$ ). При исследовании показателей программированной клеточной гибели

было обнаружено увеличение экспрессии нейтрофилами факторов апоптоза в связи с увеличением ФК ХСН.

### Заключение

Таким образом, развитие дисфункции миокарда у больных системной красной волчанкой сопровождается повышением резерва продукции супероксид-аниона нейтрофилами. У больных системной склеродермией с наличием дисфункции миокарда наблюдается увеличение резерва образования активных форм кислорода, а также снижение экспрессии проапоптозного белка бак нейтрофилами. Увеличение функционального класса хронической сердечной недостаточности при СКВ и ССД сопровождается увеличением уровня продукции и резервного потенциала образования супероксид-аниона.

### Список литературы

1. Ольбинская Л.И., Игнатенко С.Б. Роль цитокиновой агрессии в патогенезе синдрома сердечной кахексии у больных с хронической сердечной недостаточностью // Сердечная недостаточность. – 2001. – №3. – С. 132–135.
2. Baba A., Fu M. Autoantibodies in atrial fibrillation: actor, biomaker or bystander? // Autoimmunity. – 2008. – № 41(6). – P. 470–472.
3. Fu M. Autoimmunity and idiopathic dilated cardiomyopathy: where we stand? // Autoimmunity. – 2008. – № 41(6). – P. 415–418.
4. Kallwellis-Opara A., Dörner A., Poller W. Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy // Clin Res Cardiol. – 2007. – № 96(7). – P. 469–480.

### Рецензенты:

Малафеева Э.В., д.м.н., профессор кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия», г. Ярославль;

Баранов А.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия», г. Ярославль.

Работа поступила в редакцию 18.04.2011.