

ТЕРАПИЯ

Базарный В.В., Тихонина Е.А., Шилко Ю.В., Кондрашов К.В.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

*ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России
Свердловская областная клиническая больница № 1*

Еще в середине прошлого века был отмечен закономерный нейтрофильный лейкоцитоз у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ). Результаты многочисленных исследований последних лет показали, что нейтрофильные гранулоциты играют важную роль в патогенезе атерогенеза и различных клинических форм ИБС [4, 7]. Этим определяется интерес специалистов к определению маркеров воспаления и морфо-функциональных характеристик нейтрофилов у пациентов при консервативном и хирургическом лечении данного заболевания. Одним из предикторов развивающейся при ИБС воспалительной реакции, а также в качестве независимого раннего предиктора риска (ОИМ) и других кардиальных событий предложено определять активность сывороточной миелопероксидазы (МПО) [5]. При этом клиническая значимость данного параметра дискутируется [6, 9, 11]. Кроме того, в настоящее время отсутствуют устоявшиеся представления о значении определения цитоплазматической МПО и других функционально-метаболических характеристик нейтрофилов при ОИМ, «золотым стандартом» лабораторной диагностики которого остается определение тропонинов [3, 10]. При этом, несмотря на их высокую диагностическую и прогностическую значимость, у некоторых больных с высоким риском острого коронарного синдрома (ОКС) и отсутствием подъема сегмента ST, уровень тропонинов T и I нормален или уровень повышен у пациентов без ОИМ [3]. Поэтому актуальность поиска дополнительных маркеров повреждения миокарда сохраняется, в частности, в диагностике ОКС при отрицательном тропониновом тесте или невыраженных изменениях ЭКГ, что может иметь место у пожилых пациентов [2]. Этим обусловлена цель данной работы – оценить зна-

чение определения уровня внутриклеточной МПО при ОИМ.

Материалы исследования

Работа основана на анализе клинико-лабораторных данных 24 пациентов Свердловской областной клинической больницы № 1 с диагнозом – острый инфаркт миокарда, который верифицировали согласно стандартным критериям – клинические симптомы, ЭКГ исследование, лабораторные маркеры [10] в соответствии с классификацией ВОЗ (1989). До начала медикаментозной терапии диагноз был подтвержден коронароангиографией.

Контрольную группу составили 30 практически здоровых донора. Группы были сопоставимы по поло-возрастным и антропометрическим характеристикам.

Комплекс лабораторных тестов включал общеклинический анализ крови (Cell Dyne 3500), активность изофермента MB креатинфосфокиназы – КФК-MB (кинетический метод, Olympus 640), содержание аминотерминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида – NT-proBNP (Elecys, Hoffman la Roche, Швейцария) и тропонина T (полуколичественный иммунохроматографический метод, Hoffman la Roche, Германия). Исследования проводили в течение первых трех часов после поступления пациента в стационар.

Содержание цитоплазматической МПО в нейтрофилах определяли методом проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки периферической крови подвергались процедуре пермобилизации с использованием набора IntroPrep (Beckman Coulter, США), затем окрашивались четырехцветной комбинацией моноклональных антител (МКАТ) к МРО/CD79a/CD3/CD45 конъюгированных с флуоресцентными красителя-

ми FITC/PE/ECD/PC5 соответственно (Beckman Coulter, США). Окрашенные образцы анализировали на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter, США) с помощью мультипараметрического анализа (рисунок 1). Данный тест основан на способности МКАТ специфически взаимодействовать с дискретными антигенными детерминантами, экспрессированными как на поверхности лейкоцитов, так и внутри клетки. Это позволяло вести идентификацию и подсчет % клеток, содержащих внутриклеточную МПО в нейтрофилах. Эритроциты удаляли из исследуемых образцов за счет прямого лизиса с использованием реагента Versalyse (Beckman Coulter, США). Популяцию нейтрофилов выделяли при помощи гетерогенного гейтирования (область событий, имеющих низкую флуоресценцию CD45-PC5 и высокий уровень сигнала светорассеяния под углом 90° (SS)).

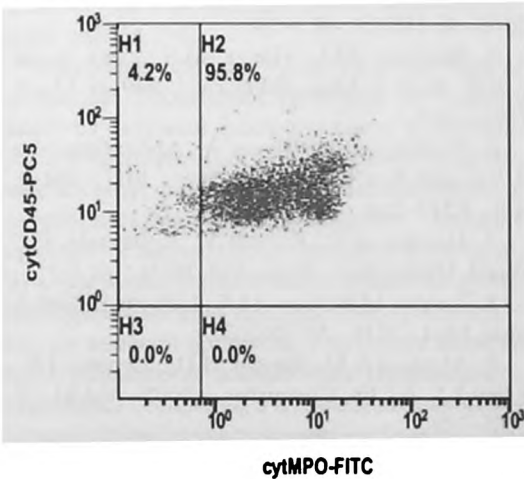


Рис. 1. Двухпараметрическая гистограмма распределения нейтрофилов периферической крови, содержащих внутриклеточную миелопероксидазу, полученная в результате многоцветного анализа с использованием комбинации моноклональных антител МРО/CD79a/CD3/CD45. Анализ проводился с использованием гейтирования по CD45

Оценку качества работы цитометра проводили ежедневно, включая проверку сигналов светорассеяния и флуоресценции с использованием калибровочных частиц Flow Chek Fluorespheres (Beckman Coulter, США) и стандартных настроечных протоколов.

Поскольку интенсивность флуоресценции от каждой конкретной клетки зависит от количества меченых МКАТ, связавшихся со специ-

фическими антигенами на поверхности клетки или внутри нее, то средняя интенсивность флуоресценции популяции клеток (MFI) может служить количественным критерием, характеризующим экспрессию антигенов (плотность рецепторов) на клетке или внутри нее.

Статистическая оценка результатов проводилась методами вариационной статистики с использованием программного пакета Statistika 5.5. Для выявления связи между признаками определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Достоверность отличий показателей между группами была подтверждена непараметрическим критерием Манна-Уитни.

Результаты исследования

При анализе лейкограммы пациентов с ОИМ регистрировался нейтрофильный лейкоцитоз (таблица 1), что является одним из рутинных лабораторных признаков заболевания.

Таблица 1
Лабораторные показатели у пациентов с ОИМ

Показатели	Контрольная группа	ОИМ
Нейтрофилы $\times 10^9/\text{л}$	$3,78 \pm 0,14$	$6,13 \pm 0,52^*$
МПО (MIF, усл.ед.)	$7,06 \pm 0,59$	$3,89 \pm 0,68^*$
NT-proBNP, нг/мл	$19,1 \pm 5,8$	$794,6 \pm 37,7^*$
КФК-МВ, Е/л	$63,4 \pm 13,7$	$419,8 \pm 139,6^*$
Тропонин Т, нг/мл	0	$2,10 \pm 0,65$

* $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Уровень внутриклеточной МПО в нейтрофилах больных снижался на 45% ($p < 0,05$) в сравнении с показателями практически здоровых лиц. Эти данные, полученные методом проточной цитометрии, оказались более значимо отличными от показателей здоровых людей, чем в случае использования нами ранее рутинной цитохимической методики выявления МПО в мазках крови [1].

На основании проведенного исследования можно заключить, что при ОИМ изменяется как количество нейтрофилов в крови, так и их функционально-метаболическое состояние. В частности, заметными оказались сдвиги кислород-зависимых внутриклеточных систем, прежде всего, МПО, которая участвует не только в киллинге микробов, но и в окислительном повреждении липопротеидов (ЛП), что ведет к повышению накопления ЛП низкой плотности в сосудистой стенке и атерогенезу [12]. Снижение уровня цитоплазматической МПО при ОИМ одновременно с повышением содержания

в крови уровня рго-BNP и КФК-MB (таблица 1) косвенно указывают на наличие взаимосвязи между функционально-метаболическим состоянием нейтрофильных гранулоцитов и повреждением миокарда. Это заключение подтверждается и установленной в данном исследовании существенной корреляционной связью между уровнем тропонина и цитоплазматической МПО ($r = 0,81$, $p < 0,05$).

Важным условием использования лабораторного теста в клинической практике является определение его диагностической чувствительности и диагностической специфичности, а интегральным показателем этих двух величин служит диагностическая эффективность (ДЭ). В нашем исследовании мы установили, что ДЭ снижения уровня MIF на 50% ниже нормы при ОИМ составляет 72%, что позволяет рассматривать данный тест в качестве дополнительной диагностической методики.

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что рядом авторов была показана активация нейтрофилов при ИБС [4, 7, 8]. В частности, отмечалось повышение активности МПО в крови у пациентов с ОКС. Она коррелировала с уровнем тропонина, возрастом, гиперхолестеринемией, значимостью сосудистых поражений [5, 6, 8]. На этом основании многими авторами высказывалось мнение о высокой диагностической значимости уровня МПО в крови при ОИМ. В нашем исследовании определение внутриклеточного уровня данного фермента имело обратную динамику – он снижался, что, скорее всего, связано с дегрануляцией нейтрофилов и выходом фермента в кровь. Величина ДЭ этого признака уступала по своему значению признанному маркеру острого повреждения миокарда – тропонину. Однако наличие существенной корреляционной зависимости в данной паре признаков указывает на потенциальную клиническую ценность определения внутриклеточной МПО в кардиологической практике.

Таким образом, нейтрофильный лейкоцитоз при ОИМ сопровождается изменением показателей функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови, прежде всего, снижением уровня МПО, что коррелирует с появлением маркеров повреждения миокарда. Диагностические характеристики данного параметра не превосходят таковые для существующих тестов (тропонин), что, тем не менее, не исключает их совместного приме-

нения в комплексе стандартных лабораторных тестов при диагностике ОИМ и для лабораторного иммунологического мониторинга пациентов с ОКС. Корректным подходом при этом является не только определение сывороточной МПО или полуколичественная оценка внутриклеточного фермента в цитохимических тестах, но и иммунофенотипирование нейтрофилов методом проточной цитометрии.

Литература

1. Базарный В.В., Тихонина Е.А., Шилко Ю.В. // Клин. лаб. диагностика. – 2007.- № 8.- С. 48–49.
2. Красносельский М.Я., Кошкина Е.В., Братанова М.З., Цурко В.В. // Кардиология.- 2007.- №11.- С. 86–91.
3. Сапрыгин Д.Б. // Лабораторная медицина - 2009. - № 10. - С. 25–28.
4. Baetta R., Corsini A. // Atherosclerosis.- 2010.- № 210 (1). - P. 1-13.
5. Brennan M.L., Penn M.S., Van Lente F. // N. Engl. J. Med.- 2003.- Vol. 349, N 17.- P. 1595–1604.
6. Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P. // Expert Rev. Cardiovasc. Ther.- 2011.- Vol. 9, N 2.- P.223–230.
7. Hosokawa T., Kumon Y., Kobayashi T. // Histol. Histopathol.- 2011.- Vol. 26, N 1.-P. 1-11.
8. Lobbes M.B., Kooi M.E., Lutgens E. //Int. J. Vasc. Med.- 2010.- № 726207.
9. Mitchell A.M., Brown M.D., Menown I.B., Kline J.A. // Clin. Chemistry. – 2005.- Vol.51.- P. 2005–2012.
10. Myocardial infarction redefined—A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction// Eur. Heart J.- 2000.- Vol. 21, N 18.- P. 1502–1513.
11. Sawicki M., Sypniewska G., Kozinski M. // Eur. J. Clin. Invest.- 2011.- Vol.41, N 6.- P. 667–671.
12. Shao B., Oda M.N., Oram J.F., Heinecke J.W. // Chem. Res. Toxicol.- 2010.- Vol. 15, N 3.- P. 447–454.