

УДК616.831-005.1:616.151.3

*О.Л. Максименко, Е.А. Статинова, Э.Ф. Баринов, Ю.И. Коценко***РЕАКЦИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ***Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького*

Реферат. Воспаление считается важным детерминантом развития осложнений ишемического инсульта. С целью анализа структурно-функционального статуса лейкоцитов проведена оценка кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов по параметрам спонтанной и индуцированной НСТ-реакции (реакции восстановления функциональной активности клеток окрашенных нитросиним тетразолием) у 40 пациентов с ишемическим инсультом на момент госпитализации. Показано, что развитие заболевания сопровождается реакцией лейкоцитов периферической крови, выраженность которой влияет на исход патологического процесса. Увеличение количества лейкоцитов и сдвиг в лейкоцитарной формуле сопровождаются нарушением кинетики нейтрофилов за счет усиления их гибели и активации механизмов респираторного взрыва в сохранившихся лейкоцитах.

Ключевые слова: ишемический инсульт, лейкоциты, НАДФН (NADPH)-оксидаза (клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс, локализирующийся на плазматической мембране)

Ишемический инсульт (ИИ) является одной из причин высокой летальности и инвалидизации [2]. В Украине ежегодно регистрируется до 120 тыс. инсультов, при этом летальность в остром периоде достигает 35 % и увеличивается на 12–15 % к концу первого года после перенесенного инцидента. Многолетние исследования в области патогенеза нарушения мозгового кровообращения позволили констатировать, что поражение мозга при инсульте является следствием процессов, связанных с ишемией, реперфузией и взаимодействием форменных элементов крови, плазмы, эндотелия, нейронов, глии и сосудистой стенки [8]. Полагают, что кооперация клеток, участвующих в альтерации тканей мозга, во многом детерминирует различную степень и характер повреждения нейронов и, соответственно, степень неврологического дефицита. Показано, что в первые минуты ишемического инсульта в зоне поражения происходит снижение кровотока более чем на 80 % [6].

При этом в центральной зоне повреждения развивается острый энергодефицит с потерей клетками мембранного потенциала действия, что ведет к временной аноксической деполяризации. Через несколько часов эти изменения из центральной зоны

ишемии распространяются на периферию с формированием «ишемической полутени» и сопровождаются включением разнообразных молекулярных каскадов [9]. На этом этапе повреждение клеток, как правило, связано с дисфункцией митохондрий и гиперпродукцией свободных радикалов кислорода, результатом чего является развитие апоптоза клеток. Дальнейшее повреждение нервной ткани в течение нескольких дней или даже недель является результатом вторичных альтеративных процессов, сопровождающих ишемию, а также — следствием развития периваскулярного отека и воспаления. Результаты исследований последних лет показали, что именно с лейкоцитами связано развитие ранних и поздних осложнений инсультов. Более того, исследования [10] выявили связь между количеством лейкоцитов в периферической крови пациентов с ИИ и вероятностью развития неблагоприятного исхода. Очевидно, что дальнейший прогресс в разработке способов коррекции воспаления при ИИ возможен при установлении особенностей патохимических процессов лейкоцитов и механизмов их регуляции.

Целью работы был анализ структурно-функционального статуса и кислород-зависимого метаболизма лейкоцитов у пациентов с ишемическим инсультом.

Материал и методы. В работе проведен анализ данных клинико-инструментального и лабораторного обследования 40 пациентов с ИИ. В качестве конечной точки учитывали исход патологического процесса: благоприятный исход был зарегистрирован у 33 пациентов, летальный — в 7 случаях. Проведено сопоставление клинико-инструментальных характеристик (пол, возраст, наличие сопутствующей патологии, выраженность неврологического дефицита, церебральная недостаточность) с параметрами реакции системы крови. Последняя включала такие показатели как: скорость оседания эритроцитов (СОЭ), количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, концентрацию фибриногена. Структурно-функциональный статус лейкоцитов оценивали после окраски мазков по Паппенгейму.

Для оценки жизнеспособности лейкоцитов проводили окраску трипановым синим (нитросиним тетразолием — НСТ). О внутриклеточном кислород-зависимом метаболизме судили по показателям НСТ-теста в нестимулированных и активируемых пирогеналом лейкоцитах.

После центрифугирования из осадка готовили мазки, фиксировали метанолом и окрашивали 0,1 % раствором сафронина. Интенсивность НСТ-реакции оценивали морфологически по количеству гранул восстановленного диформаза [6]. Кроме того, рассчитывали функциональный резерв (ФР) НСТ-реакции как отношение между интенсивностью, индуцированной и спонтанной НСТ-реакции [5]. Контрольную группу составили 10 волонтеров соответствующего возраста без клинических проявлений нарушения церебрального кровотока. Полученные данные обрабатывали методами биостатистики в пакете MedStat [4].

Результаты и обсуждение. В основной группе зарегистрирована сходная частота развития ИИ у пациентов мужского и женского пола, однако при этом отмечались значимые гендерные различия возраста больных ($p = 0,002$). Данный показатель среди мужчин составил $62,5 \pm 2,7$ года (95 % — 54–66), тогда как у женщин развитие ИИ чаще регистрировалось в возрасте $71,0 \pm 2,9$ года (95 % — 63–75). У большинства пациентов, независимо от пола и возраста, острое нарушение мозгового кровообращения развивалось на фоне артериальной гипертензии. Уровень систолического и диастолического давления не имели достоверных отличий у пациентов разного пола и не влияли на течение и исход инсульта. Однако стоит отметить, что среди мужчин частота неблагоприятных исходов была значимо выше, чем среди женщин — соответственно, $25,0 \pm 6,9$ % и $10,0 \pm 6,7$ %. Интересно, что высокая частота летальных исходов среди пациентов мужского пола была ассоциирована с выраженным лейкоцитозом и подъемом СОЭ при широком диапазоне значений данных показателей. Имеющиеся в литературе данные [10] о роли увеличения количества лейкоцитов и детерминации исхода ИИ стимулировали к анализу показателей реакции форменных элементов крови у пациентов с разным исходом инсульта. Сравнение количества лейкоцитов у пациентов с положительной динамикой и летальным исходом позволило выявить выраженные различия исходного уровня лейкоцитов ($p < 0,001$), соответственно, $7,9 \pm 0,6 \times 10^9$ /л и $19,8 \pm 8,8 \times 10^9$ /л. Данные различия были ассоциированы с подъемом абсолютного количества сегментоядерных и палочкоядерных

форм нейтрофилов. Хотя при этом СОЭ, увеличение которой считается одним из показателей выраженности воспалительного ответа, не имела достоверных различий у пациентов с разным исходом ишемического поражения мозга. Морфологическая оценка мазков крови на момент госпитализации у пациентов с ИИ выявила ряд особенностей. Во-первых, имело место формирование комплексов нейтрофилов как между собой, так и с тромбоцитами; во-вторых, отмечалась деструкция как свободных лейкоцитов (Лц), так и вовлеченных в формирование агрегатов. Морфометрический анализ мазков, окрашенных трипановым синим, свидетельствовал о снижении количества жизнеспособных лейкоцитов. В данный период наблюдения среднее количество нежизнеспособных лейкоцитов достигало $18,7 \pm 5,8$ %, (95 % — 8–45 %). Значения данного показателя у пациентов с неблагоприятным исходом существенно превышали таковые у больных с положительной динамикой лечения ($p < 0,001$); при этом процент нежизнеспособных лейкоцитов коррелировал с количеством палочкоядерных ($r = 0,671$; $p < 0,01$) и сегментоядерных нейтрофилов ($r = 0,572$; $p < 0,05$). Для выяснения механизмов гибели лейкоцитов провели анализ кислород-зависимого метаболизма. На момент госпитализации пациентов с ИИ большинство нейтрофилов находились в активированном состоянии, о чем свидетельствует повышение показателя спонтанной НСТ-реакции (сНСТ). Если у здоровых людей интенсивность сНСТ реакции составляла $0,58 \pm 0,01$, то при ИИ данный показатель варьировал от 0,4 до 1,6.

Интересно, что повышение активности НАДФ-оксидазы (клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс), локализуемой на плазматической мембране было зарегистрировано не во всех нейтрофилах, часть их находилась в состоянии лизиса, что подтверждалось окраской трипановым синим. Процент нежизнеспособных клеток варьировал от 12 до 47 % у разных пациентов. В поиске причинно-следственных связей данного феномена было проведено сопоставление данного параметра статуса Лц с клинико-лабораторными показателями у обследованных пациентов. При этом выявлена корреляционная связь с количеством сегментоядерных форм нейтрофилов (НФ) ($r = 0,518$; $p < 0,01$), уровнем СОЭ ($r = 0,423$; $p < 0,01$) и концентрацией фибриногена ($r = 0,670$, $p < 0,01$). Интересно, что уровень спонтанной НСТ-реакции отличался у пациентов с разными сроками госпитализации. Так, у пациентов, поступивших в течение первых 6–12 ч. после клинической манифеста-

ции ИИ, спонтанная НСТ-реакция недостоверно превышала контрольные значения, однако через 12–24 ч. значения данного показателя возрастали почти в 2 раза ($p < 0,01$). При отсутствии гендерных и возрастных различий выраженности НСТ-реакции, максимально различались показатели кислород-зависимого метаболизма в Лц с разным течением ИИ. Исходный показатель сНСТ у пациентов с благоприятным течением ИИ был значимо ниже ($p < 0,001$) такового у пациентов с летальным исходом, соответственно, $0,690 \pm 0,016$ (ДИ = $0,67-0,71$), и $1,40 \pm 0,03$ (ДИ $1,2-1,5$). Закономерно, что у пациентов с ИИ отмечены и статистически значимые различия показателя индуцированной НСТ-реакции (иНСТ). Если в контроле иНСТ составляла $1,59 \pm 0,03$, то у пациентов с ИИ не отмечено статистически значимого ответа НФ на введение пирогенала, что отражает ограничение механизмов индукции и лимитирование функционального резерва НАДФН-оксидазы. Зарегистрированная реакция Лц периферической крови у пациентов с ИИ, по сути, является закономерной и отражает острый воспалительный ответ на повреждение, ассоциированное с повышением продукции провоспалительных цитокинов — ИЛ-1b, ИЛ-6, ФНО-а, активацией метаболизма арахидоновой кислоты и системы комплемента крови [7]. Не менее важным триггером воспалительных событий в организме и зоне нарушения церебрального кровообращения являются тромбоциты. С одной стороны, эти форменные элементы крови непосредственно вовлечены в патогенез атеротромбоза и окклюзию церебральных сосудов, с другой — активация тромбоцитов сопровождается секрецией гранул, содержащих хемокины, и экспозицией молекул клеточной адгезии, опосредующих тромбоцит-лейкоцитарные взаимодействия [9]. Вследствие этого тромбоциты рассматриваются как ключевые индукторы воспаления в зоне повреждения сосудистой стенки. Нельзя исключить, что лейкоциты, в свою очередь, могут усиливать агрегацию тромбоцитов, а это будет усугублять ишемию в зоне окклюзии сосуда [1].

Основанием для такого предположения может быть:

- повышение продукции активных радикалов кислорода и изменение химического состава мембран форменных элементов крови;
- усиление экспрессии тканевого фактора и экспозиции молекул клеточной адгезии;
- продукция молекул, обладающих мощным протромбогенным эффектом, включая лейкотриены и фактор активации тромбоцитов;

- освобождение ферментов, модулирующих активность рецепторов на поверхности тромбоцитов [3].

Таким образом, проведенное исследование показало, что развитие ишемического инсульта сопровождается реакцией лейкоцитов периферической крови, выраженность которой влияет на исход патологического процесса. Увеличение количества лейкоцитов и сдвиг в лейкоцитарной формуле сопровождаются нарушением кинетики нейтрофилов за счет усиления их гибели и активации механизмов респираторного взрыва в сохранившихся лейкоцитах.

O.L. Maksimenko, E.A. Statinova, E.F. Barinov, Y.I. Kotsenko
LEUKOCYTES REACTION OF THE PERIFERAL BLOOD AT THE ISCHEMIC STROKE

Summary. *Inflammation is an important determinant of ischemic stroke complications development. In order to analyze the structural and functional status of leukocytes the oxygen-dependent metabolism of neutrophils was assessed by spontaneous and induced NBT-reaction in 40 patients with ischemic stroke. It was shown that development of ischemic stroke was followed by reaction of peripheral blood leukocytes, the severity of which affects the outcome of the pathological process. Increased number of white blood cells and a shift in the leukocyte count are accompanied by a violation of the neutrophils kinetics due to their increased loss and respiratory burst activation mechanisms in the remaining leukocytes.*

Key words: *ischemic stroke, leukocytes, NADPH-oxidase*

ЛИТЕРАТУРА

1. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Гнилорыбов А.М. Тромбоциты. – Д., 2012 – 316 с.
2. Губарев Ю.Д. Ишемический инсульт: вопросы патогенеза / Ю.Д. Губарев, О.А. Ефремова, Н.И. Оболонкова // Научные ведомости. – 2011. – Т. 105, № 10. – С. 5-8
3. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин. – Екатеринбург, 2001. – 315 с.
4. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю.Е. Лях, Г.В. Гурьянов, В.Н. Хоменко, О.А. Панченко. – Д., 2006. – 211 с.
5. Сулаева О.М. Дисфункція нейтрофілів у хворих з пептичними виразками, ускладненими кровотечею / О.М. Сулаева // Морфологія. – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 80-83
6. Dahlgren C. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes / C. Dahlgren, A. Karksson, J. Bylund // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 412. – P. 349-363
7. Famakin B., Mou Y., Spatz M., Lawal M., Hallenbeck J. Downstream Toll-like receptor signaling mediates adaptor – specific cytokine expression following focal cerebral ischemia // *J. Neuroinflammation.* – 2012. – N 9. – P. 174-185
8. Heiss W.D. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? // *Ann. N-Y Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 1268. – P. 26-34
9. Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M., Korthuis R.J. Cell biology of ischemia/reperfusion injury // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 298. – P. 229-317
10. Wu T.H., Chien K.L., Lin H.J. et al. Total white blood cell count or neutrophil count predict ischemic stroke events among adult Taiwanese: report from a community-based cohort study // *BMC Neurol.* – 2013. – Vol. 13 (1). – P. 7-15