

Образование радикалов кислорода лейкоцитами крови у пациентов с острым коронарным синдромом, возможность коррекции их образования триметазидином МВ

М.Г. Глезер^{1*}, С.В. Куликов², Р.Т. Сайгитов², Е.И. Асташкин¹

¹НИЦ Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова, ²Городская клиническая больница №59. Москва, Россия

Reactive oxygen species production by blood leukocytes and its correction by trimetazidine MB in patients with acute coronary syndrome

M.G. Glezer^{1*}, S.V. Kulikov², R.T. Saygитov², E.I. Astashkin¹

¹Research Centre, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, ²City Clinical Hospital No. 59. Moscow, Russia

Цель. Выявить у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) в периферической крови преактивированные (праймированные) фагоциты и оценить возможность изменения образования свободных радикалов кислорода (АФК) при добавлении к стандартной терапии триметазидина МВ.

Материал и методы. У 113 пациентов с ОКС: 86 с инфарктом миокарда (ИМ) и 27 с нестабильной стенокардией (НС), прослежена динамика в стационарном периоде лейкоцитов крови и АФК (базальная активность и стимулированная РМА (форбол-12-миристинат-13-ацетат) в образцах цельной крови методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции. У 60 пациентов оценена возможность триметазидина МВ в дозе 70 мг/сут. изменить образование АФК.

Результаты. Уровень лейкоцитов крови, базальный и РМА-стимулированный уровень продукции АФК на момент госпитализации был достоверно выше у пациентов с ИМ, чем с НС, особенно в группе умерших в последующем. Лечение триметазидином МВ способствовало более быстрому и выраженному снижению числа лейкоцитов по сравнению с пациентами, получавшими стандартную терапию — на 3-5, 7-10 и 15-21 сут госпитального наблюдения — на -20 vs -14%, на -37 vs -30% и на -47 vs -32%, соответственно. В группе пациентов, получавших триметазидин МВ, отсутствовала выраженная динамика образования базальной и РМА-стимулированной АФК, в группе стандартной терапии образование АФК увеличивалось в течение 3-15 сут. ИМ.

Заключение. Присоединение к обычной терапии больных с ОКС триметазидина МВ более значительно уменьшает число лейкоцитов периферической крови на 15-21 сут. наблюдения, предотвращая при этом их активацию в подострый период ишемии миокарда.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, лейкоциты, активные формы кислорода, триметазидин.

Aim. In patients with acute coronary syndrome (ACS), to detect pre-activated (primed) phagocytes in peripheral blood and to evaluate the effects of trimetazidine MB, when added to standard therapy, on reactive oxygen species (ROS) production.

Material and methods. In 113 hospitalised ACS patients — 86 with myocardial infarction (MI) and 27 with unstable angina (UA) — the dynamics of blood leukocytes and ROS (baseline activity and PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) stimulated activity) was assessed by lucigen-dependent chemiluminescence method. In 60 participants, trimetazidine MB (70 mg/d) effects on ROS production were investigated.

Results. At hospital admission, blood leukocyte levels, basal and PMA-stimulated ROS production were significantly higher in AMI patients (especially in those who subsequently died) than in UA participants. Trimetazidine MB therapy facilitated more rapid and manifested leukocyte count reduction, compared to the standard therapy alone: the respective reductions at Days 3-5, 7-10, and 15-21 were -20 vs. -14%, -37 vs. -30%, and -47 vs. -32%. In the trimetazidine MB group, the basal and PMA-stimulated ROS production did not change significantly, while in the standard therapy group, the ROS production increased from Day 3 to Day 15.

Conclusion. Adding trimetazidine MB to standard therapy of ACS patients significantly reduced the peripheral blood leukocyte count at Days 15-21, without leukocyte activation in the sub-acute phase of myocardial ischemia.

Key words: Acute coronary syndrome, leukocytes, reactive oxygen species, trimetazidine.

© Коллектив авторов, 2009

Тел.: (499) 972-96-12

e-mail: glezermg@mtu-net.ru

[*Глезер М.Г. — зав.лабораторией функциональных методов исследования и рациональной фармакотерапии ССЗ, ²Куликов С.В. — врач-кардиолог, ²Сайгитов Р.Т. — врач-кардиолог, ¹Асташкин Е.И. — зав.лабораторией экстремальных состояний].

Нейтрофилы и моноциты крови, поступающие в очаг некроза миокарда, играют важную роль в удалении некротизированных обломков клеток, однако при неадекватном (чрезмерном) ответе могут увеличивать объем пораженного миокарда при инфаркте (ИМ). В первые 8-12 ч после некроза в очаг поступают нейтрофилы, в более поздние сроки инфильтрация идет моноцитами. Активация фагоцитов крови проявляется в виде хемотаксиса, адгезии клеток к стенке сосудов, преактивации метаболических реакций (праймировании), выхода этих клеток из кровотока в пораженную область миокарда, где они секретируют протеолизические ферменты и радикалы кислорода. Радикалы кислорода образуются в фагоцитах крови главным образом вследствие активации восстановленного никотинадениндинуклеотидфосфата [НАД(Ф)Н] оксидазного комплекса, который состоит из двух мембранных компонентов и нескольких компонентов, локализованных в цитоплазме. Для увеличения активности НАД(Ф)Н оксидазного комплекса необходимым условием является “самосборка” всех компонентов НАД(Ф)Н оксидазного ферментативного комплекса на плазматической мембране фагоцитов, потребление больших количеств кислорода и активация других метаболических реакций. Однако выделить фагоциты из ткани миокарда у пациентов не представляется возможным.

В связи с этим целью настоящего исследования было выявить у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) в периферической крови преактивированные (праймированные) фагоциты по их способности образовывать радикалы кислорода в ответ на внешние стимулы, а также оценить возможность изменения образования радикалов при добавлении к стандартной терапии ОКС триметазидина МВ (Предуктал® МВ, Лаборатории Сервье, Франция), обладающего способностью изменять метаболизм миокарда.

Материалы и методы

В исследование включены 113 пациентов, госпитализированных в отделение кардиореанимации московской ГКБ № 59 с типичными клиническими проявлениями в виде стенокардического болевого синдрома, усилившимися в течение 14 дней, предшествующих госпитализации, либо затяжного болевого приступа продолжительностью > 20 мин и характерными ишемическими изменениями на электрокардиограмме (ЭКГ) сегмента ST (≥ 1 мм) либо зубца Т (инверсия, псевдонормализация и др.) или появлением нового патологического зубца Q. При диагностически значимом повышении креатининфосфокиназы (КФК)/КФК-МВ ($> 348/24$ Ед/л) или при повышенных уровнях тропонина I устанавливали диагноз ИМ (n=86) и при нормальных их значениях – нестабильной стенокардии (НС) (n=27). Пациенты проходили общепринятое лабораторное и инструментальное обследование, включавшие в себя клинический анализ крови,

мочи, биохимический анализ крови с определением аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, КФК, общего белка, билирубина, креатинина, мочевины. Пациентам проводились регистрация ЭКГ, эхокардиографическое (ЭхоКГ) обследование, при необходимости мониторинг ЭКГ, артериального давления (АД).

Продукция активных форм кислорода (АФК) анализировалась в образцах цельной крови (объем=100 мкл), взятой из локтевой вены в момент поступления больного в стационар и в последующие 3-5, 7-10 и 15-21 сут. госпитального наблюдения. Функциональную активность лейкоцитов оценивали на приборе Биотокс-7 (Россия) методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). Иницирование свободнорадикального окисления в модельной системе осуществляли с помощью 1 мкл форболового эфира – РМА (форбол-12-миристан-13-ацетат). Регистрация интенсивности ХЛ проводилась с использованием программы Origin 6.0 (Microcal Software, Inc). Учитывались базальная и РМА-стимулированная амплитуда ответа (импульс в сек., имп/с), а также суммарное количество АФК, образованного в ответ на стимуляцию (площадь под кривой амплитуды стимулированного ответа, регистрируемой в течение 1500 с; $\times 10^6$).

За время наблюдения умерли 12 пациентов с документированным ИМ. Расчеты производили отдельно у пациентов, умерших и выживших с ИМ, и у пациентов с НС.

В рамках исследования была выполнена работа по изучению влияния триметазидина МВ на продукцию АФК лейкоцитами периферической крови. Дизайн исследования – рандомизированное, открытое, проспективное, сравнительное, в параллельных группах (гр.). После рандомизации части больных (n=24) – основная гр. (ОГ), к лечению, рекомендованному при ОКС, добавляли Предуктал® МВ в дозе 35 мг 2 раза в сут., гр. контроля (ГК) составили пациенты (n=36), у которых использовалась стандартная терапия.

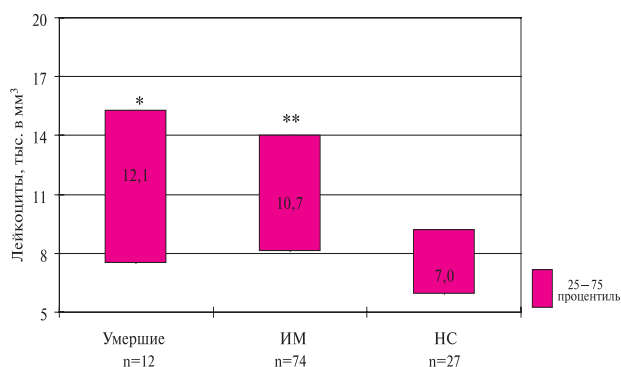
Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакета программ SPSS 12.0. Сравнение переменных с интервальной шкалой измерения, представленных в виде медианы (25;75 перцентиль), осуществлялось по методу Манна-Уитни для независимых выборок; их изменение в ходе повторного определения – по методу Вилкоксона. Величина изменения исследуемых показателей представлена в виде отношения каждого последующего определения к исходному, зарегистрированному при поступлении. Для оценки различий дискретных величин использован критерий χ^2 для частотной таблицы 2×2 и точный критерий Фишера при числе наблюдений в сравниваемых гр <5. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

В момент поступления в стационар уровень лейкоцитов в крови у пациентов с ИМ был достоверно выше, чем у лиц с НС, особенно у пациентов с последующим летальным исходом (рисунок 1).

Базальный уровень продукции АФК лейкоцитами периферической крови у пациентов с летальным исходом более чем в 4 раза превышал значения, наблюдавшиеся у пациентов с НС и благоприятным течением ИМ (рисунок 2).

РМА-стимулированный уровень продукции АФК различался только в гр. больных с летальным



Примечание: * $p=0,004$; ** $p<0,001$ — по сравнению с показателем в группе больных НС.

Рис. 1 Число лейкоцитов в периферической крови у больных ИМ и НС при поступлении.

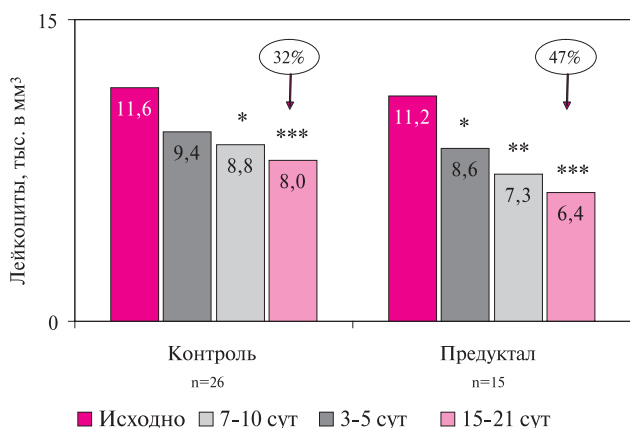
исходом ИМ и НС (амплитуда ответа 4153 (2244;11412) и 2394 (976;4730) имп/с, $p=0,063$). У больных с благоприятным исходом ИМ РМА-стимулированная продукция АФК достигала промежуточных значений — 3126 (1426;6864) имп/с.

В свою очередь, суммарное количество продуцируемых АФК в ГК не различалось (2,4 (0,9;7,6), 1,5 (0,5;3,5), 1,1 (0,5;2,0) $\times 10^6$ импульсов за 1500 с).

Клиническая характеристика больных, включенных в сравнительное исследование влияния Предуктала® МВ на продукцию АФК, представлена в таблице 1.

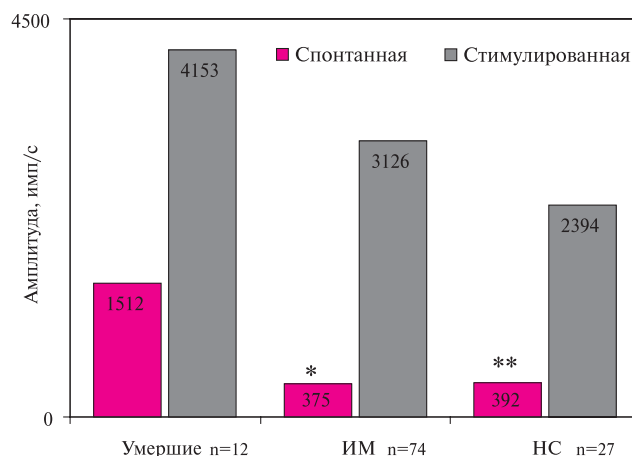
Учитывая, что практически все исследованные показатели в ГК не различались, рандомизацию можно признать успешной. Исключение составили более высокие значения систолического АД (САД) и менее частое использование ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ИАПФ) у больных, получавших стандартную терапию.

Анализ уровня лейкоцитов, а также параметров их функциональной активности показал, что эти значения у больных, лечившихся Предукталом®



Примечание: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ — по сравнению с исходным показателем.

Рис. 3 Изменение количества лейкоцитов периферической крови в ходе госпитального наблюдения.



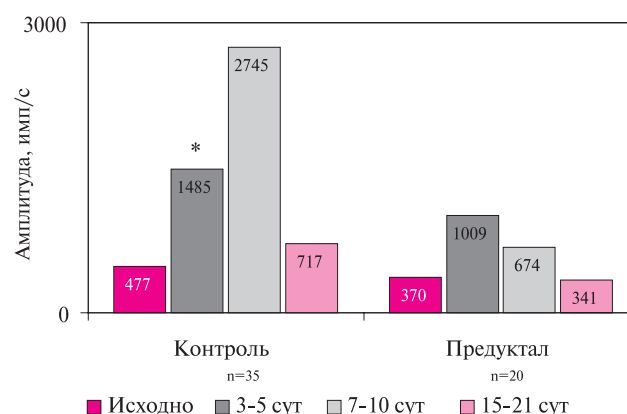
Примечание: * $p=0,03$; ** $p=0,002$ — по сравнению с показателем в группе умерших.

Рис. 2 Продукция АФК лейкоцитами периферической крови больных ИМ и НС.

МВ на момент госпитализации, не отличались от таковых у больных ГК.

В ходе госпитального наблюдения отмечалось снижение числа лейкоцитов у пациентов обеих гр. (рисунок 3). Вместе с тем, в ОГ достоверное снижение числа лейкоцитов было отмечено уже на 3-5 сут. госпитального наблюдения (-20% , $p=0,033$). Указанная тенденция сохранилась и в последующем. В частности на 7-10 сут. снижение составило уже 37% ($p=0,002$), на 15-21 сут. — 47% ($p<0,001$). В ГК значимое снижение числа лейкоцитов было отмечено только после 7 сут. госпитального наблюдения: на 3-5 сут. — -14% ($p=0,067$); 7-10 сут. — -30% ($p=0,012$); 15-21 сут. — -32% ($p<0,001$). Причем величина снижения на 15-21 сут. у больных ОГ была больше, чем в ГК ($p=0,072$).

Спонтанная продукция АФК у пациентов, получавших Предуктал® МВ, практически не изменялась. Лишь на 3-5 сут. заболевания наблюдалось небольшое повышение этого показателя на 36% ($p=0,065$) (рисунок 4). В тоже время, у пациентов ГК спонтанная продукция АФК увеличивалась зна-



Примечание: * $p=0,006$ — по сравнению с исходным показателем.

Рис. 4 Изменение амплитуды спонтанной продукции АФК в ходе госпитального наблюдения.

Таблица 1

Общая характеристика исследованных больных

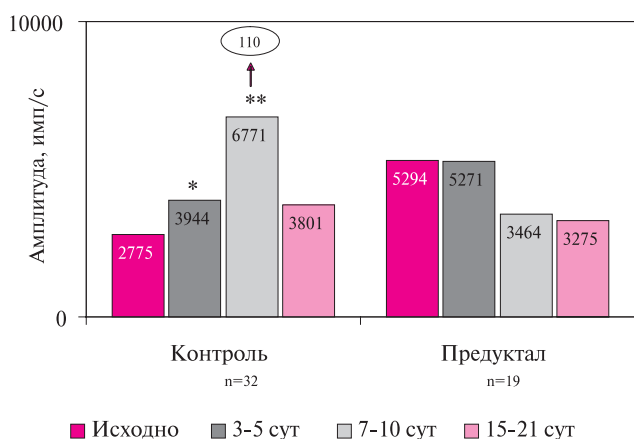
Показатель	Предуктал (-), n=36	Предуктал (+), n=24	p
Возраст, годы	67 (55;77)	68 (64;75)	0,898
Мужчины, абс. (%)	21 (58,3)	14 (58,3)	1,000
В анамнезе, абс. (%):			
Гипертония	31 (86,1)	20 (83,3)	0,768
Стенокардия	33 (91,7)	20 (83,3)	0,325
ИМ	12 (33,3)	6 (25,0)	0,490
Сахарный диабет 2-го типа	4 (11,1)	5 (20,8)	0,302
Курение	9 (25,0)	6 (25,0)	1,000
При поступлении:			
Killip ≥ 2 класса, абс. (%)	3 (8,6)	3 (13,0)	0,584
САД, мм рт.ст.	140 (130;160)	130 (120;140)	0,008
ЧСС, уд/мин	76 (66;96)	76 (60;88)	0,731
Лечение, абс. (%):			
ТЛТ ¹	24 (77,4)	15 (78,9)	0,899
Аспирин	34 (97,1)	24 (100)	0,404
НФГ ²	31 (91,2)	18 (75,0)	0,094
Нитраты	27 (77,1)	15 (62,5)	0,222
ИАПФ	27 (77,1)	23 (95,8)	0,05
Статин	27 (75,0)	17 (70,8)	0,721
Исходы, абс. (%):			
ИМ ³	31 (86,5)	19 (79,8)	0,480
Смерть	2 (5,7)	0 (0)	0,240
Смерть, рецидив ИМ, инсульт	5 (13,9)	1 (4,2)	0,219

Примечание: ¹ у больных с подтвержденным ИМ; ² нефракционированный гепарин; ³ диагноз при выписке из стационара.

чительно на 3-5 (+53%, $p=0,006$) и 7-10 (+49%, $p=0,085$) сут заболевания.

Аналогичная ситуация наблюдалась и при анализе относительно уровня продукции АФК, стимулированной РМА (рисунок 5). В гр. больных, получавших лечение Предукталом МВ, изменений стимулированной продукции АФК не наблюдалось, тогда, как в ГК увеличивались на 38% ($p=0,033$) и 110% ($p=0,002$) от исходного уровня на 3-5 и 7-10 сут., соответственно. Величина АФК, РМА-стимулированной на 7-10 сут. наблюдения у больных ГК была выше аналогичных значений у больных ОГ ($p=0,023$).

Суммарное количество продуцируемых АФК в ОГ больных в ходе госпитального наблюдения также не изменялось (рисунок 6). Напротив, у больных ГК на 7-10 сут. суммарное количество продуцируемых АФК было достоверно более высоким



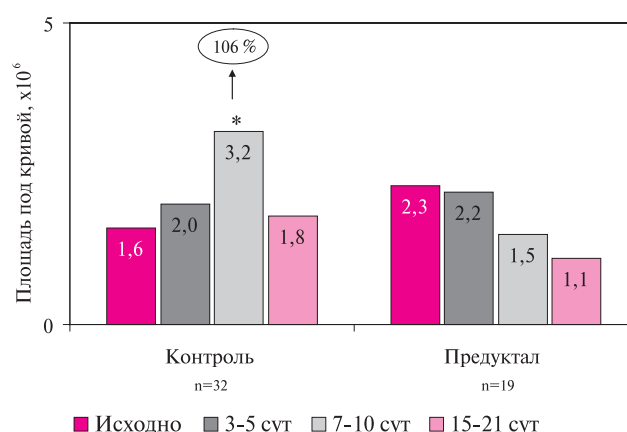
Примечание: * $p=0,033$ ** $p=0,002$ - по сравнению с исходным показателем

Рис. 5 Изменение амплитуды стимулированной продукции АФК в ходе госпитального наблюдения.

(+106%, $p=0,012$), чем вначале заболевания, причем величина эта заметно отличалась от показателя в гр. пациентов, принимавших Предуктал МВ ($p=0,043$).

Обсуждение

Уровень лейкоцитов периферической крови является простым и, вместе с тем, универсальным маркером воспаления, в т.ч. и при острой ишемии миокарда. Неоднократно было показано, что высокие значения данного показателя, определяют неблагоприятный госпитальный прогноз у больных с ОКС [1,2]. Аналогично, и в данном исследовании был продемонстрирован высокий уровень лейкоцитов и их функциональной активности, оцененной по уровню продукции АФК у пациентов с неблагоприятным исходом ИМ. Высокие значения спонтанной продукции АФК у больных с летальным исходом ИМ, по всей видимости, указывают на факт



Примечание: * $p=0,012$ — по сравнению с исходным показателем.

Рис. 6 Изменение суммарного количества продуцируемых АФК в ходе госпитального наблюдения.

уже внутрисосудистой активации лейкоцитарных клеток. Инициировать подобные события, перешагнув через этапы преактивации клеток и их последующей адгезии и миграции в очаг воспаления способны лишь необычно высокие концентрации соответствующих активаторов (цитокинов, продуктов некроза кардиомиоцитов и др.).

В ходе настоящего исследования было также показано, что относительно благоприятное течение острой ишемии миокарда сопровождается снижением числа лейкоцитов периферической крови, начиная уже с 3-5 сут. заболевания. Об этом свидетельствуют и другие исследователи — пик уровня лейкоцитов у больных ИМ приходится на 2 сут. болезни, снижаясь в последующем [3]. Данное наблюдение вполне закономерно, т. к. отражает естественное течение процесса ишемии миокарда и связанной с ним воспалительной реакции. Вместе с тем, дополнительное снижение числа лейкоцитов в гр. больных, получавших Предуктал® МВ, вероятно, указывает на более выраженную интенсивность восстановительных процессов. Об этом свидетельствует и тот факт, что в ходе госпитального наблюдения функциональная активность лейкоцитов в этой гр. практически не изменялась. Напротив, в ГК в период 3-10 сут. с момента развития острой ишемии миокарда снижение числа лейкоцитов сопровождалось увеличением продукции ими АФК. Механизм подобного благоприятного влияния Предуктала® МВ на функциональное состояние лейкоцитов неоднозначен. В большинстве исследований лечебный эффект триметазидина рассматривается с точки зрения протекции им клеток-мишеней (кардиомиоцитов и др.). Реализация данного эффекта связана с изменением метаболизма клеток, формированием устойчивости мембран клеток к

окислительному повреждению, ингибированием апоптотических процессов [4-6]. В то же время, влияние триметазидина на функцию эффекторных клеток изучено в меньшей степени. В небольшом числе работ, показано, что триметазидин способен напрямую ингибировать высвобождение гранулоцитами токсических веществ, в т.ч. АФК, регулировать функционирование митохондрий [7-10]. Вероятно и то, что ингибирующее влияние Предуктала® МВ на функциональное состояние гранулоцитов опосредовано более быстрым регрессом локальных проявлений воспаления [3]. Некоторые авторы не исключают прямого эффекта триметазидина в качестве скавенджер-агента [4], хотя в других исследованиях это наблюдение не нашло подтверждения [3]. Тем не менее, ряд исследований показывает возможность защитного действия Предуктала® МВ от ишемически/реперфузионного повреждения [9,11].

Таким образом, показано, что уровень лейкоцитов периферической крови и, в меньшей степени, уровень продукции АФК, зарегистрированные при поступлении в стационар, связаны с неблагоприятным прогнозом развития ОКС. В процессе традиционной терапии больных с ОКС в течение всего срока госпитального наблюдения отмечается снижение числа лейкоцитарных клеток. Напротив, в период 3-10 сут. наблюдения степень их функциональной активности заметно повышается, результатом чего является более чем двукратное увеличение продукции АФК. Добавление к обычной терапии больных с ОКС Предуктала® МВ приводит к более значительному уменьшению числа лейкоцитов периферической крови на 15-21 сут. наблюдения, предотвращая при этом их активацию в подострый период ишемии миокарда.

Литература

1. Furman IM, Davidson CM, Anderson AF. Relationship between elevated leukocyte count and hospital clinical events in patients with acute coronary syndromes: findings from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Circulation* 2001; 104(12): 3074.
2. Grzybowski M, Welch DR, Parsons L, et al. The association between white blood cell count and acute myocardial infarction in-hospital mortality: findings from the National Registry of Myocardial Infarction. *Acad Emerg Med* 2004; 11(10): 1049-60.
3. Shinozaki K, Tamura A, Watanabe T, et al. Significance of neutrophil counts after reperfusion therapy in patients with a first anterior wall acute myocardial infarction. *Circ J* 2005; 69: 526-9.
4. Gambert S, Vergely C, Filomenko R, et al. Adverse effects of free fatty acid associated with increased oxidative stress in post-ischemic isolated rat hearts. *Mol Cell Biochem* 2006; 283(1-2): 147-52.
5. Yin RX, Liang WW, Liu TW, et al. Inhibitory effect of trimetazidine on cardiac myocyte apoptosis in rabbit model of ischemia-reperfusion. *Chin Med Sci J* 2004; 19(4): 242.
6. Tetik C, Ozden A, Calli N, et al. Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int* 1999; 12(2): 108-12.
7. Fabiani JN, Farah B, Vuilleminot A, et al. Chromosomal aberrations and neutrophil activation induced by reperfusion in the ischaemic human heart. *Eur Heart J* 1993; 14: 12-7.
8. Argaud L, Gomez L, Gateau-Roesch O, et al. Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39(6): 893-9.
9. Kutala VK, Khan M, Mandal R, et al. Attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury by trimetazidine derivatives functionalized with antioxidant properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317(3): 921-8.
10. Labrou A, Giannoglou G, Zioutas D, et al. Trimetazidine administration minimizes myocardial damage and improves left ventricular function after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; 7(2): 143-50.
11. Романов В.А., Кратнов А.Е., Романова Н.В., Хрусталева О.А. Особенности кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов у больных нестабильной стенокардией и его коррекция Предукталом. *Патолог физ эксперим тер* 2003; 3: 14-7.

Данная работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований по гранту 07-04-01452

Поступила 02/11-2009