

УДК 616.127-005.8-036.11:616.155.32:616.839-07-092.9

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ К НЕЙРОМЕДИАТОРАМ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА В КЛИНИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2006 Л.В. Лимарева¹

С помощью комплексного подхода с использованием морфометрических и иммунологических методов на основе системного многофакторного анализа выявлены особенности влияния ацетилхолина и норадреналина на лимфоциты периферической крови человека и животных (беспородные собаки) в норме и при остром инфаркте миокарда. Показано, что ацетилхолин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л у здоровых доноров и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л у интактных животных индуцирует процессы апоптоза в лимфоцитах *in vitro*. Анализ полученных математических моделей морфофункционального состояния лимфоцитов крови при инфаркте миокарда выявил сходный характер изменений у человека и животных.

Введение

Изучение и расшифровка механизмов взаимодействия иммунной и нервной систем в норме и при различных патологических состояниях является одним из наиболее актуальных направлений современной биологической и медицинской науки [1]. В свете последних открытий в области такого общебиологического феномена как апоптоз, возникла возможность дальнейшей разработки принципиально новых направлений превентивного лечения сердечно-сосудистых заболеваний [2, 3] и в, частности, инфаркта миокарда, являющегося по своей летальности и распространённости одним из ведущих заболеваний среди населения экономически развитых стран [4]. Вместе с тем до настоящего времени не изучены механизмы влияния нейромедиаторов вегетативной нервной системы на апоптоз лимфоцитов, участвующих в патогенезе инфаркта миокарда [5].

Целью настоящей работы явилась оценка особенностей влияния нейромедиаторов вегетативной нервной системы на лимфоциты крови в норме и при остром инфаркте миокарда с помощью комплекса морфометрических, иммунологических и математических методов анализа.

¹Лимарева Лариса Владимировна (larisa-limareva@yandex.ru), Центральная научно-исследовательская лаборатория Самарского государственного медицинского университета, 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

1. Материалы и методы исследования

Была исследована кровь 20 человек (14 мужчин и 6 женщин в возрасте 45–60 лет), госпитализированных с диагнозом острый инфаркт миокарда с зубцом Q. Больные получали стандартную терапию, им проводились общепринятые функционально-диагностические исследования. Кровь для дополнительных иммунологических исследований забирали на основании добровольно-информированного согласия в объеме 2 мл (в качестве антикоагулянта использовали КзЭДТА) через 1, 3, 7 и 14 суток после постановки диагноза. Контрольную группу составили 20 здоровых доноров сопоставимого возраста и пола.

Экспериментальная часть работы была выполнена на 40 половозрелых здоровых беспородных собаках, содержащихся в стандартных условиях вивария. У животных в состоянии премедикации забирали кровь для исследования, снимали ЭКГ. Под теопенталовым наркозом воспроизводили инфаркт миокарда путём перевязки нисходящей ветви левой венечной артерии на границе верхней и средней её трети, через 40 минут снимали ЭКГ для подтверждения воспроизведения инфаркта миокарда по признакам нарастающей ишемии. Через 1, 3, 7 или 14 суток у животных забирали кровь из бедренной вены для исследования, вводили внутривенно теопентал натрия, снимали ЭКГ и выводили из эксперимента передозировкой наркоза, вскрывали грудную полость, забирали материал для морфологического исследования из центра ишемизированной области миокарда с целью подтверждения развития инфаркта миокарда.

Цельную кровь в объеме 0,1 мл вносили в микропробирки на 1,5 мл Ахуген (США) и инкубировали в термостате при температуре 37 °C в среде с 5% содержанием CO₂ в течение 120 минут с равным объемом питательной среды 199 (контроль), ацетилхолина (в конечных концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л), норадреналина (в конечных концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и преднизолона (Gedeon Rihter, конечная концентрация $0,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Затем пробы центрифугировали при 300 g в течение 5–7 минут, надосадочную жидкость удаляли. Из части полученного осадка делали мазки и окрашивали их по Романовскому–Гимзе.

Оценку морфометрических параметров проводили с помощью автоматизированной системы визуализации изображений, созданной в ЦНИЛ Самарского государственного медицинского университета, и программного обеспечения Image Tool. Определяли площадь лимфоцитов (S_K), площадь ядра (S_Y), ядерно-цитоплазмное отношение ($ЯЦО = (S_K - S_Y) / S_Y$).

В оставшемся осадке клеток проводили тест на жизнеспособность с трипановым синим и иммунофенотипирование лимфоцитов методом лазерной проточной цитометрии. Определяли относительное количество CD3⁺ и CD3⁺CD95⁺ лимфоцитов на проточном цитометре Becton Dickinson FACS Calibur с помощью компьютерной программы Cell Quest Pro. Рассчитывали индекс сдвига нейромедиатора по формуле:

$$\frac{(CD_K^+ - CD_0^+) \cdot 100\%}{CD_K^+},$$

где CD_K^+ — процент Т-лимфоцитов, позитивных по конкретному антигену дифференцировки в контроле (инкубация в питательной среде), CD_0^+ — те же клетки после инкубации с изучаемыми веществами.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для определения оптимального количества опытов,

необходимого для получения выводов с заданной вероятностью и допустимой ошибкой (0,95 и 0,05 соответственно) проводилось определение необходимого числа наблюдений в основном эксперименте на базе дисперсионного анализа. Дополнительно проводили системный многофакторный анализ, для чего вычисляли коэффициенты влияния конкретных параметров (P_i) и интегральные показатели системы (Xb_i), а также оценивали математическую модель системы, как изменение интегральных показателей в динамике инфаркта миокарда [6].

2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Предварительный эксперимент

На первом этапе работы нами была решена задача по подбору оптимальных условий инкубации лимфоцитов цельной крови человека и животных с изучаемыми нейромедиаторами и определению наименьшего числа наблюдений для получения статистически значимых результатов.

Анализ полученных результатов показал, что растворы ацетилхолина и норадреналина в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л имели pH в пределах физиологических значений (pH 7,2–7,4), инкубация с ними в течение 120 минут при 37 °C не приводила к гибели лимфоцитов. Так, жизнеспособность клеток в пробах составила 95–98%. Однако, ацетилхолин в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л вызывал повышение вязкости образцов крови, что делало невозможным их использование для морфометрии и иммунофенотипирования методом проточной цитометрии. Поэтому в дальнейшем данные концентрации в эксперименте не использовали.

На основании данных, полученных в предварительном эксперименте, было рассчитано, что для морфометрии оптимальное число объектов измерения в препарате составило в среднем 27 ± 9 и 32 ± 11 клеток в препарате для человека и животных соответственно, количество образцов крови должно составлять 31 ± 14 и 20 ± 9 .

2.2. Изучение влияния ацетилхолина и норадреналина на морфофункциональные характеристики лимфоцитов периферической крови в норме.

При визуальном анализе препаратов крови с помощью светового микроскопа было выявлено, что ацетилхолин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л у человека и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л у животных вызывал появление в лимфоцитах признаков апоптоза (наличие апоптотических телец). Известно, что такие изменения в клетках наблюдаются при инкубации крови с глюкокортикоидами, например, с преднизолоном — известным индуктором апоптоза лимфоцитов [7]. Поэтому мы провели дополнительную серию экспериментов (инкубация цельной крови с преднизолоном в тех же условиях), позволяющую сравнить изменения в клетках под действием норадреналина, ацетилхолина и преднизолона и интерпретировать их как влияние исследуемых веществ на выраженность процессов апоптоза в лимфоцитах. Учитывая тот факт, что морфометрическим признаком апоптоза является сморщивание и изменение объемов клеток, нами была проведена сравнительная оценка влияния преднизолона, ацетилхолина и норадреналина на уменьшение размеров лимфоцитов крови и изменение соотношения ядра и цитоплазмы в них.

Анализ данных, полученных при изучении морфометрических изменений лимфоцитов (таблица) показал, что преднизолон в концентрации $0,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л и у человека и у животных в норме статистически значимо уменьшал площадь лимфоцитов, площадь ядра и площадь клетки, что является характерной особенностью процессов апоптоза, при этом ядерно-цитоплазматическое отношение увеличивалось за счет увеличения площади цитоплазмы.

При исследовании влияния ацетилхолина на морфометрические проявления апоптоза было обнаружено, что ацетилхолин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л у здоровых доноров и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л у животных статистически значимо уменьшал площадь клетки и площадь ядра, что также может свидетельствовать о наличии процессов апоптоза в лимфоцитах. Ядерно-цитоплазматическое отношение уменьшалось незначительно.

Норадреналин ни в одной из использованных концентраций не оказывал статистически значимых изменений площади клеток и их ядер. Ядерно-цитоплазматическое отношение в лимфоцитах здоровых доноров незначительно уменьшалось за счет более выраженного уменьшения площади ядра. В лимфоцитах животных данный показатель практически не изменялся.

Таким образом, анализ влияния норадреналина, ацетилхолина и преднизолона на морфометрические параметры лимфоцитов крови человека и животных в норме показал, что нейромедиатор парасимпатического звена вегетативной нервной системы (ацетилхолин) способен индуцировать процессы апоптоза лимфоцитов периферической крови человека и собак *in vitro*. Нейромедиатор симпатического звена вегетативной нервной системы — норадреналин — в использованной экспериментальной системе не вызывает подобных изменений.

2.3. Оценка влияния ацетилхолина и норадреналина на экспрессию CD3 и CD95 антигенов лимфоцитами крови человека и животных в норме

Известно, что увеличение экспрессии CD95 антигена (Fas-антиген) на поверхности лимфоцитов является одним из признаков активации и одновременно готовности клетки к апоптозу [8]. В связи с этим нам представлялось важным изучить влияние нейромедиаторов вегетативной нервной системы на способность лимфоцитов представлять на своей поверхности данный антиген. Анализ полученных данных (рис. 1) показал, что ацетилхолин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л оказывает статистически значимое увеличение экспрессии CD95 антигена на поверхности лимфоцитов крови здоровых доноров. Лимфоциты крови животных также реагируют на инкубацию с данным медиатором (в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л) определённым увеличением числа CD95⁺ клеток, однако эти изменения статистически не значимы.

Норадреналин в использованных концентрациях не влиял на экспрессию Fas-антигена лимфоцитами крови человека и животных.

Для выявления специфичности выявленных изменений была проведена оценка влияния нейромедиаторов на экспрессию лимфоцитами CD3⁺ антигена (маркер общей популяции зрелых Т-лимфоцитов). Было выявлено (рис. 2), что ацетилхолин не вызывал статистически значимого увеличения содержания CD3⁺ лимфоцитов в крови человека и животных. В то же время инкубация крови с норадреналином в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л приводила к снижению экспрессии CD3 антигена лимфоцитами человека и животных.

Таблица
Влияние ацетилхолина, норадреналина и преднизолона на морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови человека и животных в норме

Параметры	Объект исследования	Ацетилхолин		Норадреналин		Преднизолон	Контроль
		$1 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$1 \cdot 10^{-6}$ моль/л	$1 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$1 \cdot 10^{-6}$ моль/л	$0,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л	
Площадь клетки, pixels ²	Здоровые доноры	5746,3 ± 542,2*	7125,7 ± 389,5	6957,4 ± 526,6	7154,9 ± 515,2	5269 ± 236,9*	7535,8 ± 421,3
	Интактные животные	8104,6 ± 765,2	5986,8 ± 524,6*	7964,5 ± 456,8	8125,6 ± 799,4	5984,5 ± 356,8*	8902,2 ± 800,5
Площадь ядра, pixels ²	Здоровые доноры	4005,3 ± 169,9*	4152,8 ± 369,5	4356,1 ± 215,8	4985,5 ± 366,2	4123,8 ± 225,8*	4800,6 ± 269,2
	Интактные животные	4112,7 ± 396,8	3795,6 ± 212,7*	5988,2 ± 685,5	4751,2 ± 255,3	4328,8 ± 368,2*	5175,3 ± 368,5
Ядерно-цитоплазматическое отношение	Здоровые доноры	1,69 ± 0,17	1,77 ± 0,11	1,68 ± 0,08	1,84 ± 0,12	2,15 ± 0,24	1,98 ± 0,18
	Интактные животные	1,56 ± 0,16	1,45 ± 0,09	2,05 ± 0,22	1,87 ± 0,19	1,97 ± 0,20	1,69 ± 0,14

Примечание: * — статистически значимые отличия от контрольных показателей ($p < 0,05$)

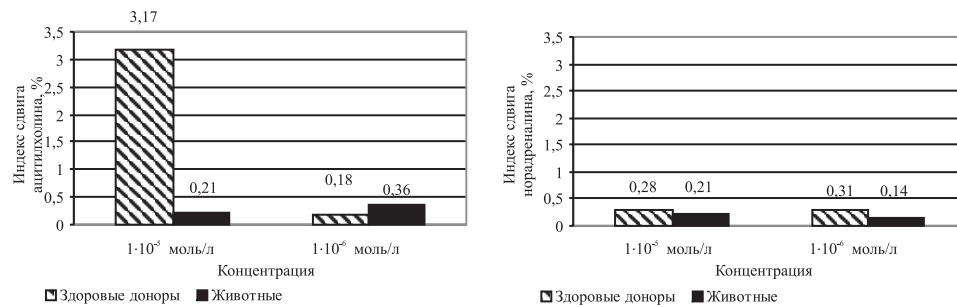


Рис. 1. Влияние ацетилхолина и норадреналина на экспрессию CD95 антигена лимфоцитами крови в норме

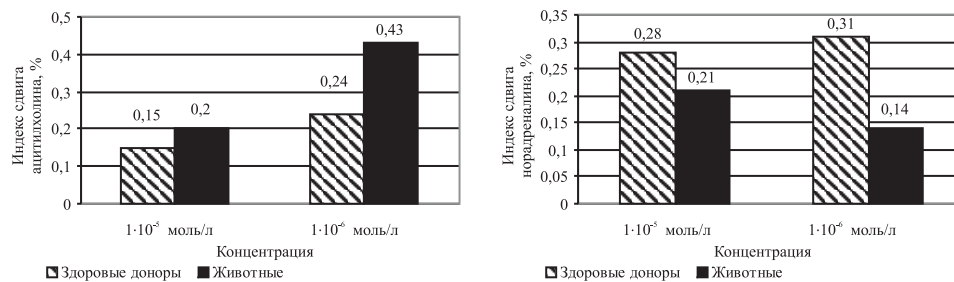


Рис. 2. Влияние ацетилхолина и норадреналина на экспрессию CD3 антигена лимфоцитами крови в норме

Следующим этапом работы было исследование чувствительности лимфоцитов крови к нейромедиаторам вегетативной нервной системы при остром инфаркте миокарда в клинике и эксперименте.

2.4. Изучение влияния норадреналина и ацетилхолина на лимфоциты периферической крови при остром инфаркте миокарда

С целью интегральной и объективной оценки изменений морфофункционального состояния лимфоцитов крови при инфаркте миокарда полученные показатели были обработаны с помощью системного многофакторного анализа с математическим моделированием. Анализ полученных математических моделей морфофункционального состояния лимфоцитов крови при инфаркте миокарда выявил сходный характер изменений у человека и животных (рис. 3): в обоих случаях имели место колебательные изменения активности лимфоцитов, как биологической системы, в динамике развития инфаркта миокарда с максимальным отклонением от нормы через 3 суток после операции.

Таким образом, предложенный комплекс морфометрических, иммунологических и математических методов исследования позволил оценить влияние нейромедиаторов вегетативной нервной системы на лимфоциты крови человека и собак *in vitro*, в том числе и на выраженность процессов апоптоза в норме и при остром

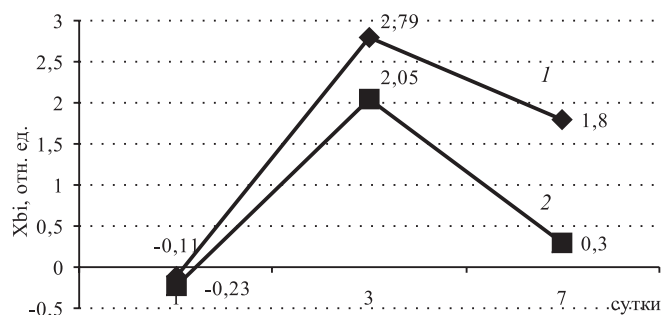


Рис. 3. Изменение интегральных показателей морфофункционального состояния лимфоцитов крови человека 1 и собак 2 с учётом чувствительности к нейромедиаторам вегетативной нервной системы в динамике инфаркта миокарда

инфаркте миокарда, что расширяет методическую базу для изучения такого общебиологического феномена как апоптоз и для разработки новых терапевтических подходов в лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Литература

- [1] Хаитов, Р.М. Физиология иммунной системы / Р.М. Хаитов. – М., 2001. – 224 с.
- [2] Galang N., Sasaki H., Maulik N. Apoptotic cell death during ischemia / reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy / N. Galang, H. Sasaki, N. Maulik [Symposium "Emerging Potentials for the Antioxidant Therapy", Goa, 9 Jan., 1999]. Toxicol. – 2000. – V. 148. – No. 2–3. – P. 111–118.
- [3] Чумаков, П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью / П.М. Чумаков // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – №1. – С. 34–47.
- [4] Оганов, Р.Г. Стратегия ведения больных с острым инфарктом миокарда / Р.Г. Оганов // Материалы научно-практической конференции "Новые пути вторичной профилактики инфаркта миокарда". – М., 24 марта 2006 г.
- [5] Барышников, А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – М.: Эдиториал УРСС. – 2002. – 320 с.
- [6] Углов, Б.А. Системный многофакторный анализ / Б.А. Углов, М.В. Углова, Г.П. Котельников. – Самара, 1994. – 68 с.
- [7] Черных, Е.И. Апоптоз лейкоцитов периферической крови, индуцированный действием гипертермии и преднизолона, у лиц с расстройствами адаптации / Е.И. Черных, К.Г. Языков, В.Я. Семке // Общая патология и патологическая физиология. – 2002. – Т. 134. – No.12. – С. 617–619.
- [8] Involvement of the CD95(APO-1/ Fas) receptor and ligand in liver damage / P.R. Galle // J. Exp. Med. – 1995. – V. 182. – No. 5. – P. 1223–1230

Поступила в редакцию 26/VIII/2006;
в окончательном варианте — 26/VIII/2006.

**COMPLEX ESTIMATION OF SENSITIVITY
OF BLOOD LYMPHOCYTES TO NEUROMEDIATORS
OF VEGETATIVE NERVOUS SYSTEM AT THE ACUTE
MIOCARDIAL INFARCTION IN CLINIC
AND EXPERIMENT**

© 2006 L.V. Limareva²

By the aid of a complex approach using morphometrical and immunological methods based on system multifactor analysis, features of acetylcholine and noradrenalin effect on peripheral blood lymphocytes of the person and dogs in norm and at a acute myocardial infarction are studied. It is shown that acetylcholine in vitro induces processes of apoptosis of lymphocytes at healthy donors ($1 \cdot 10^{-5}$ M/l) and at intact animals ($1 \cdot 10^{-6}$ M/l). The analysis of the received mathematical models of morphofunctional conditions of blood lymphocytes at a myocardial infarction demonstrates similar character of changes at the person and animals.

Paper received 26/ VIII/2006.

Paper accepted 26/ VIII/2006.

²Limareva Larisa Vladimirovna (larisa-limareva@yandex.ru), Central Scientific Research Laboratory, Samara State Medical University, Samara 443099, Russia.