

1973. – Vol. 10, № 3. – P. 1-62.  
6. A survey of wound monitoring and topical antimicrobial therapy practices in the treatment of burn injury / T. E. Taddonio [et al.] // The Journal of burn care & rehabilitation. – 1990. – Vol. 11, №. 5. – P. 423-427.  
7. Protocol for a systematic review of quantitative burn wound microbiology in the management of burns patients / J. Kwei [et al.] // Systematic reviews. – 2015. – Vol. 4, №. 1. – P. 150.  
8. Quantitative microbiology in the management of burn patients. II. Relationship between bacterial counts obtained by burn wound biopsy culture and surface alginate swab culture, with clinical outcome following burn surgery and change of dressings / J. A. Steer [et al.] // Burns. – 1996. – Vol. 22, №. 3. – P. 177-181.  
9. Weinstein, R. A. The epidemiology of burn wound infections: then and now / R. A. Weinstein, C. G. Mayhall // Clinical infectious diseases. – 2003. – Vol. 37, №. 4. – P. 543-550.  
10. White, M. C. Early diagnosis and treatment of toxic shock syndrome in paediatric burns / M. C. White, K. Thornton, A. E. R. Young // Burns. – 2005. – Vol. 31, №. 2. – P. 193-197.  
11. Robson, M. C. Predicting skin graft survival / M. C. Robson, T. J. Krizek // Plastic and Reconstructive Surgery. – 1973. – Vol. 52, №. 3. – P. 330.  
12. Young, A. E. Toxic shock syndrome in burns: diagnosis and management / A. E. Young, K. L. Thornton // Archives of Disease in Childhood-Education and Practice. – 2007. – Vol. 92, №. 4. – P. ep97-ep100.  
13. Bactericidal and wound-healing properties of sodium hypochlorite solutions: the 1991 Lindberg Award / J. P. Heggers [et al.] // The Journal of burn care & rehabilitation. – 1991. – Vol. 12, №. 5. – P. 420-424.  
14. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis / R. C. Bone [et al.] // Chest. – 1992. – Vol. 101, №. 6. – P. 1644-1655.  
15. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis / M. M. Levy [et al.] // Intensive care medicine. – 2010. – Vol. 36, №. 2. – P. 222-231.  
16. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) / M. Singer [et al.] // Jama. – 2016. – Vol. 315, №. 8. – P. 801-810.  
17. Comparative usefulness of sepsis-3, burn sepsis, and conventional sepsis criteria in patients with major burns / J. Yoon [et al.] // Critical care medicine. – 2018. – Vol. 46, №. 7. – P. e656-e662.

### Сведения об авторах

В.А. Багин — канд. мед. наук, доц. кафедры анестезиологии, реаниматологии и токсикологии, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

М.Н. Астафьева — аспирант кафедры анестезиологии, реаниматологии и токсикологии, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

В.А. Руднов — д-р мед. наук, проф., проф. кафедры анестезиологии, реаниматологии и токсикологии, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

Адрес для переписки: baginvla@gmail.com.

## ЗНАЧЕНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ НЕЙТРОФИЛОВ В ЛАБОРАТОРНОМ МОНИТОРИНГЕ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

УДК 616.127-092.19

**В.В. Базарный<sup>1</sup>, Е.А. Партылова<sup>2</sup>, Ю.В. Шилко<sup>2</sup>, К.В. Кондрашов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>2</sup>Свердловская областная клиническая больница № 1, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Цель работы — сравнительная оценка количественных и функциональных параметров нейтрофилов крови, определенных методом проточной цитометрии, у пациентов с разными формами ИБС.

У пациентов с острым инфарктом миокарда и хронической ИБС определяли количество нейтрофилов и содержание в них миелопероксидазы методом проточной цитометрии, а также уровень маркеров повреждения миокарда в сыворотке крови. Установлено повышение уровня нейтрофилов, в том числе молодых форм с одновременным снижением уровня внутриклеточной миелопероксидазы. Эти изменения были более выражены при остром инфаркте миокарда, чем при хронической ИБС. Показана корреляционная связь содержания миелопероксидазы с концентрацией тропонина.

Исследование нейтрофилов периферической крови методом проточной цитометрии с определением внутриклеточной миелопероксидазы может рассматриваться в качестве дополнительного инструмента лабораторной диагностики ИБС.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, миелопероксидаза, ИБС.

## SIGNIFICANCE OF NEUTROPHIL FLOW CYTOMETRY IN LABORATORY MONITORING IN CORONARY HEART DISEASE

**V.V. Bazarny<sup>1</sup>, E.A. Partylova<sup>2</sup>, Yu.V. Shilko<sup>2</sup>, K.V. Kondrashov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

The aim of the work is a comparative assessment of quantitative and functional parameters of blood neutrophils in patients with different forms of ischemic heart disease (IHD).

In patients with acute myocardial infarction and IHD disease, the number of neutrophils, the content of myeloperoxidase in them by flow cytometry, the level of markers of myocardial damage in immunochemical tests were determined. An increase in the level of neutrophils, including band forms, with a decrease in the level of intracellular myeloperoxidase was established. These changes were more significant in acute myocardial infarction than in IHD. The correlation of the myeloperoxidase level with troponin concentration is shown.

The study of peripheral blood neutrophils by flow cytometry with the determination of intracellular myeloperoxidase can be considered as an additional tool for laboratory diagnosis of ischemic heart disease.

**Keywords:** neutrophils, myeloperoxidase, ischemic heart disease.

Диагностика ишемической болезни сердца (ИБС) включает сложный комплекс клинических, инструментальных и лабораторных методов. Среди лабораторных давно известны нейтрофильный лейкоцитоз — один из первых лабораторных симптомов острого инфаркта миокарда (ОИМ). Однако в силу низких чувствительности и специфичности он не используется в настоящее время в клинической практике. Тем не менее, нейтрофилы играют ключевую роль в механизмах повреждения миокарда при ИБС [1]. В частности, установлено, что аккумуляция нейтрофилов в стенках коронарных артерий повышает риск летальности у пациентов с ОИМ [2]. Нейтрофилы участвуют в ремоделировании сердца после инфаркта, формировании неоинтимы после ангиопластики [3]. Несмотря на то, что в настоящее время существуют устоявшиеся представления о лабораторной диагностике ОИМ, у некоторых больных с высоким риском острого коронарного синдрома (ОКС) и отсутствием подъема сегмента ST, уровень тропонин-Т и I нормален, или уровень повышен у пациентов без ОИМ. Поэтому актуальность поиска дополнительных биомаркеров повреждения миокарда сохраняется, в частности, в диагностике ОКС при отрицательном тропониновом тесте или невыраженных изменениях ЭКГ [4, 5]. На роль одного из таких маркеров претендует миелопероксидаза (МПО) — фермент, содержащийся в нейтрофилах и появляющийся при их разрушении в сыворотке. Данный показатель используется в оценке, развивающейся при ИБС, воспалительной реакции и в качестве независимого предиктора раннего риска инфаркта миокарда и других кардиальных событий [6, 7]. В отечественной практике тест определения МПО в сыворотке для диагностики ИБС пока не нашел применения и не получил должной клинической оценки. Ранее нами были показаны существенные отличия в определении содержания данного фермента и неферментных катионных белков, установленных цитохимическим методом, у разных групп пациентов с ИБС и в прогнозировании осложнений ее хирургического лечения [8, 9]. Между тем, остается нерешенным вопрос о значении определения уровня внутриклеточной МПО при различных формах ИБС, что и определило цель данной работы — провести сравнительную оценку количественных и функциональных параметров нейтрофилов крови у пациентов с разными формами ИБС.

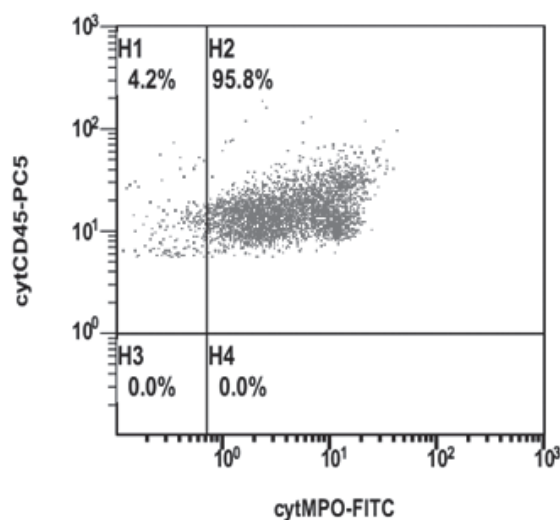
### Материалы и методы

Работа основана на анализе клинико-лабораторных и иммунологических данных 46 пациентов с диагнозом «хроническая ишемическая болезнь сердца» (ХИБС), «стенокардия II-III функциональный класс», и 21 пациента с диагнозом «острый инфаркт миокарда», поступивших в ГУЗ СО СОКБ № 1 г. Екатеринбурга (руководитель центра — д.м.н. Э.М. Идов). Выраженность стенокардии определялась по классификации CCS, определение сердечной недостаточности по стадиям осуществлялось согласно класси-

кации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA, 1964). Диагноз верифицировали согласно стандартным критериям: клинические симптомы, ЭКГ-исследование, лабораторные маркеры в соответствии с классификацией ВОЗ (1989) [10]. До начала медикаментозной терапии диагноз был подтвержден коронароангиографией. Контрольную группу составили 20 практически здоровых доноров. Группы были сопоставимы по поло-возрастным и антропометрическим характеристикам.

Лабораторное обследование пациентов включало клинический анализ крови (Cell Dye 3500) с ручным подсчетом лейкоцитарной формулы по стандартной методике и последующим расчетом ядерного индекса нейтрофилов (соотношение палочкоядерных и сегментоядерных форм). В сыворотке крови иммунохимическими методами определяли содержание аминотерминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида NT-proBNP (Elecsys, Hoffman la Roche, Швейцария) и тропонина (полуколичественный иммунохроматографический метод, Hoffman la Roche, Германия).

Содержание цитоплазматической МПО в нейтрофилах оценивали 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 МПО/CD79а/CD3/CD45, конъюгированных с флуоресцентными красителями FITC/PE/ECD/PC5 соответственно (Beckman Coulter, США). Окрашенные образцы анализировали на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter, США) с помощью мультипараметрического анализа (рис.).



Двухпараметрическая гистограмма распределения нейтрофилов периферической крови, содержащих внутриклеточную миелопероксидазу, полученная в результате многоцветного анализа с использованием комбинации моноклональных антител МПО/CD79а/CD3/CD45. Анализ проводился с использованием гейтирования по CD45

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. Популяцию нейтрофилов выделяли при помощи гетерогенного гейтирования (область событий, имеющих низкую флуоресценцию CD45-PC5 и высокий уровень сигнала светорассеяния под углом 90° (SS)).

Учитывая, что интенсивность флуоресценции от каждой конкретной клетки зависит от количества меченых МКАТ, связавшихся со специфическими 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.

Диагностическую чувствительность тестов рассчитывали как соотношение истинно положительных и истинно отрицательных результатов у пациентов. Статистическая оценка результатов проводилась методами вариационной статистики с использованием программного пакета Statistika 5.5 при помощи персонального компьютера IBM PC под управлением операционной системы Microsoft Windows XP. Для выявления связи между признаками определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Достоверность отличий показателей между группами была подтверждена параметрическим критерием Стьюдента.

### Результаты

При анализе лейкограммы пациентов с ОИМ регистрировался нейтрофильный лейкоцитоз — увеличение числа нейтрофилов на 62% ( $p < 0,05$ ), чего при ХИБС не наблюдалось (табл.). Это является известным лабораторным признаком заболевания. Увеличения ядерного индекса нейтрофилов при ОИМ указывает на наличие острого воспалительного процесса.

Таблица  
Лабораторные показатели у пациентов с ИБС

Показатели	Контрольная группа	ОИМ	ХИБС
Нейтрофилы $\times 10^9/\text{л}$	3,78 $\pm$ 0,14	6,13 $\pm$ 0,52*	4,52 $\pm$ 0,17
Ядерный индекс нейтрофилов	0,05 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,01*	0,06 $\pm$ 0,03
МПО (MIF, усл.ед.)	7,06 $\pm$ 0,59	3,89 $\pm$ 0,68*	4,25 $\pm$ 0,17*
Тропонин, нг/мл	0	2,10 $\pm$ 0,65	0
NT-proBNP, нг/мл	19,1 $\pm$ 5,8	794,6 $\pm$ 37,7*	521,7 $\pm$ 24,6*

Примечание: \* —  $p < 0,05$ .

Изменение количества нейтрофилов у больных с ОИМ закономерно сопровождалось существенным возрастанием уровня тропонина — современного маркера острого повреждения миокарда. Одновременно увеличивалась кон-

центрация NT-proBNP: в 41 раз — у пациентов с ОИМ и в 27 раз — при ХИБС. Эти данные убедительно подтверждают наличие патологии сердечной мышцы у всех пациентов, зависящие от формы ИБС.

Уровень внутриклеточной МПО в нейтрофилах больных ОИМ снижался на 45%, при ХИБС — на 40% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с показателями контрольной группы. Эти данные, полученные методом проточной цитометрии, оказались значимо отличными от показателей здоровых людей, чем в случае использования нами рутинной цитохимической методики выявления МПО в мазках крови [11]. При этом показатель MIF у пациентов с ХИБС существенно не отличался от такового при ОИМ. Снижение уровня цитоплазматической МПО при ИБС одновременно с повышением содержания в крови уровня тропонина и pro-BNP при ОИМ может косвенно указывать на наличие взаимосвязи между функционально-метаболическим состоянием нейтрофильных гранулоцитов и повреждением миокарда. Это предположение 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 ценности. В нашем исследовании мы установили, что диагностическая чувствительность снижения уровня MIF на 50% ниже нормы при ОИМ составляет 80%.

### Обсуждение

Нейтрофильный лейкоцитоз хотя и считается устаревшим лабораторным тестом при ИБС, продолжает привлекать внимание исследователей. Наряду с показанным в нашей работе и известным фактом повышения числа нейтрофилов (в том числе палочкоядерных форм) [8, 9], в последние годы обнаружены новые возможности использования количественных показателей клинического анализа крови. Например, показано, что не только увеличение количества нейтрофилов, но и среднего объема клетки характерно для ОИМ, а повышение соотношения нейтрофилы / лимфоциты может рассматриваться как фактор риска инфаркта миокарда, в том числе у пациентов с ОКС без подъема сегмента ST [12, 13, 14, 15].

Изменение уровня МПО в сыворотке крови при ИБС ранее было показано рядом авторов. В частности, отмечалось повышение активности МПО в крови у пациентов с ОКС. Она коррелировала с уровнем тропонина, возрастом, гиперхолестеринемией, значимостью сосудистых поражений [2, 5, 7, 8, 9, ]. Это отчасти связано с тем, что МПО 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 [2, 16]. Неудивительно, что в этом процессе принимают участие не только

жизнеспособные гранулоциты, но и так называемые «нейтрофильные ловушки», формирующиеся фактически из продуктов разрушения клетки и содержащие цитоплазматические ферменты [17].

В нашем исследовании показано, что нейтрофильный лейкоцитоз при ОИМ сопровождается снижением уровня внутриклеточной МПО при ИБС, что, скорее всего, связано с дегрануляцией нейтрофилов и выходом фермента в кровь. Величина диагностической чувствительности этого признака уступала по своему значению признанному маркеру острого повреждения миокарда — тропонину, хотя и имела с ним существенную корреляционную зависимость. При хронической форме ИБС увеличения числа нейтрофильных гранулоцитов не отмечено, но изменения уровня МПО были аналогичными.

НКБ (лизоцим, лактоферрин и другие), локализованные в лизосомах нейтрофилов, активно участвуют в кислороднезависимых процессах киллинга, и скорее всего, именно им принадлежит важная роль в реализации воспалительного процесса при ИБС [18]. Определение их уровня оказалось практически неинформативным показателем в диагностике ИБС. Однако в ранее выполненных исследованиях нами показано, что этот тест может оказаться полезным в прогнозировании развития осложнений у пациентов после аортокоронарного шунтирования [19].

Таким образом, исследование нейтрофилов периферической крови методом проточной цитометрии является дополнительным инструментом лабораторной диагностики ИБС.

### Литература

- Baetta, R. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives / Baetta R., Corsini A. // *Atherosclerosis*. – 2010. – № 210 (1). – P. 1-13.
- Prognostic value of culprit site neutrophils in acute coronary syndrome / K. Distelmaier, M. P. Winter, F. Dragschitz [et al.] // *Eur J Clin Invest*. – 2014. – Vol. 44 (3). – P. 257-65. – Doi: 10.1111/eci.12228.
- Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction / F. Carbone, A. Nencioni, F. Mach [et al.] // *Thromb Haemost*. – 2013. – Vol. 110 (3). – P. 501-14. – Doi: 10.1160/TH13-03-0211.
- Chan, C. P. Pathophysiological roles and clinical importance of biomarkers in acute coronary syndrome / Chan C. P., Rainer T. H. // *Adv Clin Chem*. – 2013. – Vol. 59. – P. 23-63.
- High-sensitivity cardiac troponin T for earlier diagnosis of acute myocardial infarction in patients with initially negative troponin T test-comparison between cardiac markers / M. Kitamura, N. Hata, T. Takayama [et al.] // *J Cardiol*. – 2013. – Vol. 62 (6). – P. 336-42. – Doi: 10.1016/j.jjcc.2013.06.005.
- Risk prediction with serial myeloperoxidase monitoring in patients with acute chest pain / S. J. Nicholls, W. H. Tang, D. Brennan [et al.] // *Clin Chem*. – 2011. – Vol. 57 (12). – P. 1762-70. – Doi: 10.1373/clinchem.2011.166827.
- Diagnostic efficacy of myeloperoxidase for the detection of acute coronary syndromes / M. Sawicki, G. Sypniewska, M. Kozinski // *Eur. J. Clin. Invest*. – 2011. – Vol. 41, № 6. – P.667-671.
- Базарный, В. В. Определение миелопероксидазы нейтрофилов при хирургическом лечении ишемической болезни сердца / В. В. Базарный, Е. Н. Тихонина, К. В. Кондрашов // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2012. – № 7. – С. 8-10.
- Клиническая оценка морфофункциональных особенностей нейтрофильных гранулоцитов при ишемической болезни сердца / В. В. Базарный, Е. А. Партылова, Ю. В. Шилко, К. В. Кондрашов // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2018. – Т. 15, № 5. – С. 684-690.
- 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, № 18. – P. 1502-1513.
- Базарный, В. В. Цитохимическая характеристика нейтрофильных гранулоцитов при различных вариантах ишемической болезни сердца / В. В. Базарный, Е. А. Тихонина, Ю. В. Шилко // *Клин. лаб. диагностика*. – 2007. – № 8. – С. 48-49.
- Elevated mean neutrophil volume represents altered neutrophil composition and reflects damage after myocardial infarction / G. P. van Hout, W. W. van Solinge, C. M. Gijssberts [et al.] // *Basic Res Cardiol*. – 2015. – Vol. 110 (6). – P. 58. – Doi: 10.1007/s00395-015-0513-6.
- The relationship between neutrophil/lymphocyte ratio and infarct-related artery patency before mechanical reperfusion in patients with ST-elevation myocardial infarction / A. Kurtul, S. N. Murat, M. Yarlioglues [et al.] // *Coron Artery Dis*. – 2014. – Vol. 25 (2). – P. 159-66. – Doi: 10.1097/MCA.0000000000000067.
- Prognostic Value of Neutrophil to Lymphocyte Ratio for In-hospital Mortality in Elderly Patients with Acute Myocardial Infarction / T. M. Guo, B. Cheng, Ke L. [et al.] // *Curr Med Sci*. – 2018. – Vol. 38 (2). – P. 354-359. – Doi: 10.1007/s11596-018-1887-0.
- Neutrophil-lymphocyte ratio is a marker of survival and cardiac complications rather than patency following revascularization of lower extremities / L. Pourafkari, C. Choi, R. Garajehdaghi [et al.] // *Vasc Med*. – 2018. – Doi: 10.1177/1358863X18774623.
- Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein / B Shao, M. N. Oda, J. F. Oram [et al.] // *Chem. Res. Toxicol*. – 2010. – Vol. 15, № 3. – P.447-454.
- Döring, Y. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis / Y. Döring, O. Soehnlein, C. Weber // *Circ Res*. – 2017. – Vol. 17. – P. 736-743. – Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309692.
- Shinagawa H, Frantz S. Cellular immunity and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of neutrophils, monocytes, and macrophages / H. Shinagawa, S. Frantz // *Curr Heart Fail Rep*. – 2015. – Vol. 12 (3). – P. 247-54. – Doi: 10.1007/s11897-015-0255-7.
- Патент № 2480757 Российская Федерация, МПК G01N 33/50. Способ прогнозирования послеоперационных осложнений при аортокоронарном шунтировании : 2012108264/15 : заявл. 05.03.2012 : опубл. 27.04.2013 / Базарный В. В., Тихонина Е. А., Кондрашов К. В. ; заявитель ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России. – 4 с.

### Сведения об авторах

В.В. Базарный — д-р мед. наук, проф. кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

Е.А. Партылова — канд. мед. наук, врач, Свердловская областная клиническая больница № 1;

Ю.В. Шилко — зав. кардиологическим отделением, Свердловская областная клиническая больница № 1;

К.В. Кондрашов — канд. мед. наук, зав. кардиохирургическим отделением, Свердловская областная клиническая больница № 1.

**Адрес для переписки:** vlad-bazarny@yandex.ru.