

## АКТИВНІСТЬ МОНОЦИТІВ/МАКРОФАГІВ У ХВОРИХ ІЗ СИНДРОМОМ ХРОНІЧНОЇ СЕРЦЕВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ІШЕМІЧНОГО ГЕНЕЗУ

Федоров С.В.

Івано-Франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Україна

**Резюме.** Мета дослідження: визначити функціональну активність моноцитів/макрофагів периферійної крові хворих із хронічною серцевою недостатністю ішемічного генезу шляхом вивчення спонтанної продукції ними цитокінів в умовах *in vitro*.

**Матеріали і методи:** обстежено 96 хворих із синдромом ХСН II-IV ФК (NYHA), який виник унаслідок ішемічної хвороби серця (ІХС). Моноцити/макрофаги виділяли з периферійної крові та визначали методом ІФА спонтанну продукцію ними цитокінів: інтерлейкінів -1 $\beta$ , -6 та -10.

**Результати.** Моноцити/макрофаги характеризувалися підвищеною спонтанною продукцією інтерлейкінів -1 $\beta$ , -6 та зниженням екскреції інтерлейкіну-10, що залежало від функціонального класу ХСН.

**Висновок.** Моноцити/макрофаги периферійної крові в хворих із синдромом хронічної серцевої недостатності ішемічного генезу перебувають у стані хронічної активації, свідченням чого є надмірна продукція прозапальних та недостатне утворення протизапальних цитокінів.

**Ключові слова:** хронічна серцева недостатність, моноцити/макрофаги, цитокіни.

**Вступ.** Відомо, що 18 мільйонів смертей у світі щорічно трапляється внаслідок серцево-судинних недуг [1]. Починаючи з 30-х років минулого сторіччя частота випадків серцево-судинних захворювань (ССЗ) збільшувалася в країнах із розвинутою економікою [2]. Із середини 1970-х зростання випадків кардіоваскулярної смертності стабілізувалось у ряді високорозвинутих країн завдяки редукції ризик-чинників та покращення лікування ССЗ. Натомість, зазначений показник зріс у країнах низької та проміжної економіки [3].

Хронічна серцева недостатність (ХСН) є кінцевою стадією більшості захворювань серця та головною причиною захворюваності і смертності. Відповідно до даних, представлених Європейським Кардіологічним Товариством (European Society of Cardiology, ESC), на континенті налічується близько 15 мільйонів пацієнтів із зазначеним синдромом [4]. ХСН є причиною 5% випадків негайної госпіталізації, 10% загальної зайнятості ліжка в стаціонарах; на її лікування витрачається понад 2% національних видатків на охорону здоров'я [5].

Останні десятиріччя ознаменувалися появою досліджень щодо ролі імунної активації та системного запалення при прогресуванні ХСН.

Відповідно до цієї концепції, неспецифічна активація моноцитів/макрофагів, яка реалізується при важких порушеннях мікроциркуляції, є індуктором синтезу прозапальних цитокінів, що визначають еволюцію дисфункції лівого шлуночка [6]. Паралельно вивчається роль інших чинників: лейкоцитів та їхніх субпопуляцій, імуноглобулінів, аутоантитіл та циркулюючих імунних комплексів.

**Обґрунтування дослідження.** Відомо, що лейкоцити – це класичний маркер хронічного та гострого запалення. Абсолютне число нейтрофілів та загальний вміст лейкоцитів є незалежними предикторами несприятливих кардіоваскулярних подій та важливим біомаркером ССЗ. Зокрема, висновки дослідження Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) свідчать, що підвищений вміст білих кров'яних тілець та гранулоцитів є незалежними чинниками формування синдрому ХСН в осіб середньої вікової групи [7]. Ще одне популяційне дослідження показало асоціацію між кількістю лейкоцитів та випадками госпіталізації з приводу загострень ХСН у чоловіків з попереднім анамнезом ІМ [8]. Результати Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) також відмітили зв'язок лейкоцитозу зі зниженням фракції викиду лівого шлуночка, погіршенням якості життя та виживанням пацієнтів [9]. Проспективний аналіз досліджень Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) засвідчив факт незалежної асоціації числа лейкоцитів із новими випадками ХСН у хворих на гострий ІМ [10].

Натомість, результати одного невеликого дослідження Paris Prospective Study II показали, що тільки моноцити можуть бути предикторами несприятливих кардіальних подій [11].

Ми припускаємо, що моноцити/макрофаги відіграють провідну роль у формуванні синдрому ХСН. Дане припущення обумовило планування дослідження.

**Мета дослідження:** визначити функціональну активність моноцитів/макрофагів периферійної крові хворих із хронічною серцевою недостатністю ішемічного генезу шляхом вивчення спонтанної продукції ними цитокінів в умовах *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Обстежено 96 хворих із синдромом ХСН II-IV ФК (NYHA), який виник унаслідок ішемічної хвороби серця (ІХС). Діагноз ХСН виставляли на підставі скарг, анамнезу, даних фізикального, лабораторного та інструментального обстеження з урахуванням

рекомендацій Європейського кардіологічного товариства “ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2016” [12]. Ішемічну природу ХСН верифікували на підставі наявності в анамнезі перенесеного інфаркту міокарда (ІМ), результатів проведення проб із дозованим фізичним навантаженням (тредміл-тест, велоергометрія), даних коронароангіографії відповідно до рекомендацій Європейського кардіологічного товариства “2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease” [13]. Контрольну групу склали 30 практично здорових осіб, репрезентативних за віком і статтю. Проведення дослідження ґрунтувалося на засадах етичних принципів щодо наукових досліджень із включенням людей (Хельсинська декларація) та положень рекомендацій належної клінічної практики (GCP – good clinical practice).

Із метою оцінки функціонального стану моноцитів/макрофагів периферійної крові проводили їхнє виділення за методом Н. Recalde [14]. Після центрифугування крові при 700g упродовж 20 хвилин відбирали плазму і лейкоконцентрат. Для видалення тромбоцитів лейкоконцентрат двічі промивали 6 – 8 об'ємами фосфатно-солевого буферу, центрифугуючи щоразу при 200g по 5 хвилин. Суспензію моноцитів отримували шляхом флотації в градієнті густини (1,077 – 1,078) суміші “фікол (Uppsala, Швеція)-верографін (Spofa, Чехія)” після попередньої інкубації лейкоконцентрату при 37°C у вільній від тромбоцитів аутологічній плазмі. Після перерахунку та розподілу ( $1 \times 10^6$  клітин на лунку) проводили інкубацію моноцитів у середовищі 199, що містило 30% аутосироватку крові, інактивовану в термостаті при температурі 56°C протягом 2-х годин, 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10 мкг/мл фунгізону (Gibco, Grand Island, NY, USA) у 24-лункових пластикових кластерах для тканинних культур (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) упродовж доби при температурі 37°C в атмосфері 5% вуглекислого газу + 95% атмосферного повітря. Після інкубації супернатант обережно відбирали та заморожували при температурі -20°C до наступного визначення базальної продукції цитокінів.

Концентрацію цитокінів у сироватці крові чи супернатанті культури моноцитів/макрофагів визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА) на аналізаторі “Stat Fax 303 Plus” (США) за допомогою наборів реагентів “ProCon IL-1 $\beta$ ”, “ProCon IL-6”, (ООО “Протеиновый контур”, Росія), “Biotrak IL-10 EIA System” (Amersham Pharmacia Biotech, Великобританія). Статистичний аналіз проводили з використанням стандартного пакету програм “Statistica for Windows 12.0” (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

**Результати дослідження.** Моноцити/макрофаги, виділені з крові хворих із ХСН, характеризуються надмірною спонтанною продукцією в культуральне середовище ряду прозапальних цитокінів. Так, екскреція інтерлейкіну-1 $\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ) була в 2,3 раза вищою за умови наявності ХСН:

(119,50 $\pm$ 4,12) пг/10<sup>6</sup> кл., на противагу (51,39 $\pm$ 3,71) пг/10<sup>6</sup> кл. - у групі контролю (p<0,001).

Подібно вищою була продукція моноцитами/макрофагами інтерлейкіну-6 (ІЛ-6): (6,62 $\pm$ 0,41) пг/10<sup>6</sup> кл. – при ХСН та (2,79 $\pm$ 0,28) пг/10<sup>6</sup> кл. – у практично здорових осіб (у 2,4 раза (p<0,001)).

Водночас, відмічали на 35,3% нижчі рівні спонтанної продукції протизапального цитокіну інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) за умови наявності синдрому ХСН – (3,79 $\pm$ 0,41) пг/10<sup>6</sup> кл., проти контрольних значень ((5,86 $\pm$ 0,76) пг/10<sup>6</sup> кл.) (p<0,01).

**Таблиця 1. Спонтанна продукція цитокінів моноцитами/макрофагами в умовах in vitro у хворих із ХСН**

Показник	Функціональний клас ХСН (NYHA)		
	II, n=27	III, n=39	IV, n=30
ІЛ- $\beta$ , пг/10 <sup>6</sup> кл., M $\pm$ m	96,27 $\pm$ 3,14	115,12 $\pm$ 4,75 p <sub>1</sub> <0,05	147,11 $\pm$ 4,34 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
ІЛ-6, пг/10 <sup>6</sup> кл., M $\pm$ m	5,11 $\pm$ 0,45	6,41 $\pm$ 0,37 p <sub>1</sub> <0,05	8,34 $\pm$ 0,44 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,01
ІЛ-10, пг/10 <sup>6</sup> кл., M $\pm$ m	5,21 $\pm$ 0,45	3,21 $\pm$ 0,47 p <sub>1</sub> <0,05	2,96 $\pm$ 0,33 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,05

Примітки: 1. ХСН – хронічна серцева недостатність;  
2. p<sub>1</sub> – вірогідність різниці між показниками ФК II та ФК III;  
3. p<sub>2</sub> – вірогідність різниці між показниками ФК III та ФК IV.

Зі зростанням ФК синдрому ХСН відмічається збільшення спонтанної продукції моноцитами/макрофагами ІЛ-1 $\beta$  (табл. 1). Зокрема, при ФК II даний показник склав (96,27 $\pm$ 3,14) пг/10<sup>6</sup> кл.; при ФК III – (115,12 $\pm$ 4,75) пг/10<sup>6</sup> кл., що в 1,2 раза більше (p<0,05); при ФК IV – (147,11 $\pm$ 4,34) пг/10<sup>6</sup> кл., що в 1,5 раза більше від подібного значення при другому та в 1,3 раза більше від подібного значення при третьому ФК (p<0,01).

Найвищі рівні екскреції ІЛ-6 моноцитами/макрофагами спостерігали при ХСН ФК IV: (8,34 $\pm$ 0,44) пг/10<sup>6</sup> кл. Це було в 1,3 раза більше, ніж аналогічний показник при ХСН ФК III (6,41 $\pm$ 0,37) пг/10<sup>6</sup> кл. (p<0,01), та в 1,6 раза – від подібного параметру при ХСН ФК II – (5,11 $\pm$ 0,45) пг/10<sup>6</sup> кл. (p<0,01). Значення спонтанної продукції моноцитами/макрофагами

ІЛ-6 при ФК ІІІ в 1,3 раза перевищувало подібне при ФК ІІ ( $p < 0,05$ ).

У міру прогресування ХСН зауважили негативну динаміку середніх значень екскреції моноцитами/макрофагами ІЛ-10: ( $5,21 \pm 0,45$ ) пг/ $10^6$  кл. – при ФК ІІ; ( $3,21 \pm 0,47$ ) пг/ $10^6$  кл. – при ФК ІІІ ( $\Delta = -38,4\%$ ;  $p < 0,05$ ); ( $2,96 \pm 0,33$ ) пг/ $10^6$  кл. – при ФК ІІІІ ( $\Delta = -43,2\%$ ;  $p < 0,01$  – у порівнянні з ФК ІІ;  $\Delta = -7,8\%$ ;  $p < 0,05$  – у порівнянні з ФК ІІІ).

**Обговорення результатів.** Макрофаги утворюються з моноцитів залежно від дії оточуючого середовища та його стимулів. Подібно до диференціації Т-хелперних лімфоцитів, макрофаги активуються по двох шляхах. Виділяють класично активований шлях (M1) та альтернативно активований шлях (M2) їхньої диференціації [15]. M1 тип макрофагів бере участь в процесах Th1-шляху імунної відповіді в якості ефекторних клітин; M2 тип клітин залучений до процесів імуносупресії та загоєння тканин [16]. При цьому, активовані за M1-шляхом макрофаги продукують значну кількість прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-23 тощо), а диференційовані за M2-шляхом – протизапальні ІЛ-10, ІЛ-1ra [16].

Ряд експериментальних та клінічних досліджень показали, що гіперпродукція моноцитами/макрофагами прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-1 $\alpha$ ) негативно впливає на загоєння міокарду після інфаркту та призводить до формування ХСН [17]. Наявність дисбалансу в екскреції про- та протизапальних цитокінів у нашому випадку може бути свідченням надмірної активності M1-типу макрофагів, які є потенційно прозапальними.

Численними клінічними дослідженнями підтвержене значення потенційно прозапальних моноцитів/макрофагів у несприятливому прогнозі в хворих із ССЗ. Зокрема, результати НОМе SWEET НОМе study показали, що високий рівень даного типу клітин асоціюється зі значним ступенем ймовірності виникнення ІМ при хронічних формах ІХС [18]. Інші дослідження виявили подібний зв'язок зі зниженням ФВ лівого шлуночка в постінфарктних пацієнтів та повторні вінцеві події в хворих зі ХХН чи інсультом [19, 20].

**Висновок.** Моноцити/макрофаги периферійної крові в хворих із синдромом хронічної серцевої недостатності ішемічного генезу перебувають у стані хронічної активації, свідченням чого є надмірна продукція прозапальних та недостатнє утворення протизапальних цитокінів.

#### Література:

1. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. / C.J.L. Murray, T. Vos, R. Lozano [et al.] // *Lancet*. - 2012. - Vol. 380. - P. 2197-2223.  
2. O'Flaherty M. Contributions of treatment and lifestyle to declining CVD mortality: why have CVD mortality rates declined so much since the 1960s? / M. O'Flaherty, I. Buchan, S. Capewell //

*Heart*. - 2013. - Vol. 99. - P. 159-162.

3. The social transition of risk factors for cardiovascular disease in the African region: evidence from three cross-sectional surveys in the Seychelles. / S. Stringhini, B. Viswanathan, J. Gédéon [et al.] // *Int. J. Cardiol.* - 2013. - Vol. 168. - P. 1201-1206.

4. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 / J. McMurrey, S. Adamopoulos, S. Anker [et al.] // *Eur. Heart J.* - 2012. - Vol. 33. - P.1787-1847.

5. The current cost of heart failure to the national health service in UK / S. Stewart, A. Jenkins, S. Buchan [et al.] // *Eur. Heart Fail.* - 2002. - Vol. 4. - P.361-371.

6. Force T.L. Heart failure: molecules, mechanisms and therapeutic targets. / T.L. Force // *Circul.* - 2007. - Vol. 115. - P. e347-e349.

7. White blood cell count, C-reactive protein, and incident heart failure in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. / W. Bekwelem, P.L. Lutsey, L.R. Loehr [et al.] // *Ann. Epidemiol.* - 2011. - Vol.21. - P. 739-748.

8. Engström G. Leukocyte count and incidence of hospitalizations due to heart failure. / G. Engström, O. Melander, B. Hedblad // *Circ. Heart Fail.* - 2009. - Vol. 2. - P.217-222.

9. White blood cell count and mortality in patients with ischemic and nonischemic left ventricular dysfunction (an analysis of the Studies of Left Ventricular Dysfunction [SOLVD]). / H.A. Cooper, D.E. Exner, M.A. Waclawiw [et al.] // *Am. J. Cardiol.* - 1999. - Vol. 84. - P.252-257.

10. Association between white blood cell count, epicardial blood flow, myocardial perfusion, and clinical outcomes in the setting of acute myocardial infarction: A Thrombolysis In Myocardial Infarction 10 Substudy. / H.V. Barron, C.P. Cannon, S.A. Murphy [et al.] // *Circul.* - 2000. - Vol. 102. - P. 2329-2334.

11. Olivares R. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? / R. Olivares, P. Ducimetiere, J.R. Claude // *Am. J. Epidemiol.* - 1993. - Vol. 137. - P.49-53.

12. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)/ Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. // *Eur. Heart J.* - 2016. - Vol.37. - P.2129-2200.

13. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012)/ J. Perk, G. Bucker, H. Gohlke [et al.] // *Eur Heart J.* - 2012. - Vol. 33 (13). - P. 1635-1701.

14. Recalde H.R. A simple method of obtaining monocytes in suspension / H.R. Recalde // *J. Immunol. Meth.* - 1984. - Vol.69. - P.71-77.

15. Gordon S. Monocyte and macrophage heterogeneity. / S. Gordon, P.R. Taylor // *Nat. Rev. Immunol.* - 2005. - Vol. 5. - P. 953-964.

16. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from



GM-CSF and M-CSF origin. /M. Jaquin, N. Houlbert, O. Fardel [et al.] // Cell Immunol. -2013. – Vol. 281. – P.51-61.

17. Hilgendorf I. Making a difference: monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. / I. Hilgendorf, F.K. Swirski // Curr. Atheroscler. Rep. - 2012. –Vol.14. –P.450–459.

18. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. / K.S. Rogacev, B. Cremers, A.M. Zawada [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. - 2012. –Vol.60. – P.1512-1520.

19. CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. / K.S. Rogacev, S. Seiler, A.M. Zawada [et al.] // Eur. Heart J. - 2011. – Vol.32. – P.84-92.

20. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. / X. Urra, N. Villamor, S. Amaro [et al.] // J. Cereb. Blood Flow. Metab. -2009. –Vol.29. –P.994-1002.

УДК: 616.12-008.1+616-002-008.953-092

## АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ У БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ИШЕМИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА

Федоров С.В.

Ивано-Франковский национальный медицинский университет, г. Ивано-Франковск, Украина.

**Резюме.** Цель исследования: изучить функциональную активность моноцитов/макрофагов периферической крови больных из хронической сердечной недостаточности ишемического генеза путем определения спонтанной продукции ими цитокинов в условиях *in vitro*.

**Материалы и методы:** обследованы 96 больных из синдромом ХСН II-IV ФК (NYHA), который возник вследствие ишемической болезни сердца. Моноциты/макрофаги выделяли с крови и изучали методом ИФА спонтанную продукцию ими цитокинов: интерлейкинов -1 $\beta$ , -6, -10.

**Результаты.** Моноциты/макрофаги характеризировались увеличением спонтанной продукции провоспалительных интерлейкинов -1 $\beta$ , -6 и снижением образования интерлейкина-10, заивисмо от функционального класса СН.

**Выводы.** Моноциты/макрофаги больных из синдромом ХСН ишемического генеза характеризуются состоянием хронической активации, что проявляется увеличенной продукцией провоспалительных на фоне дефицита противовоспалительных цитокинов.

**Ключевые слова:** хроническая сердечная недостаточность, моноциты/макрофаги, цитокины.

UDC: 616.12-008.1+616-002-008.953-092

## THE ACTIVITY OF MONOCYTES/MACROPHAGES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC CHRONIC HEART FAILURE

S. V. Fedorov

Ivano-Frankivsk National Medical University. Ivano-Frankivsk, Ukraine.

**Abstract.** Chronic heart failure (CHF) is a complex clinical syndrome that results from any structural or functional impairment of ventricular filling or ejection of blood. It is a major health issue in society today, because it is associated with health, death and consumption of healthcare resources. HF affects approximately 1-2% of adults in developed countries, and prevalence increases markedly with age: 10% in cohort 75 years and older.

**The aim of study** was to evaluate of functional activity of blood monocytes/macrophages in patients with ischemic CHF by identification of their spontaneous production of cytokines.

**Material and methods.** 96 patients with CHF of ischemic genesis were observed. The diagnosis was verified by clinical, laboratory and instrumental methods according to European Society of Cardiology recommendations (2013, 2016). Patients were divided into 3 subgroups (according New-York Heart Association (NYHA) functional class (FC) classification of HF): FC II (NYHA) – 27 patients, FC III (NYHA) – 39 patients and FC IV (NYHA) – 30 patients. Control group consist of 30 practically healthy persons. Suspension of monocytes from blood obtained by Recalde H. method. Interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), and interleukin 10 (IL-10) levels in culture supernatant were determined using commercial ELISA kits (ProCon, Russia; Amersham Pharmacia Biotech, UK) according to the manufacturer's instructions. Statistical analyses were performed using the Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Statistical significance was assumed at  $p < 0.05$ .

**Results.** The *in vitro* spontaneous production of proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6 by monocytes/macrophages in patients with HF was significant higher than in control group: (119.50 $\pm$ 4.12) pg/10<sup>6</sup> cells vs (51.39 $\pm$ 3.71) pg/10<sup>6</sup> cells ( $p < 0.001$ ) and (6.62 $\pm$ 0.41) pg/10<sup>6</sup> cells vs (2.79 $\pm$ 0.28) pg/10<sup>6</sup> cells ( $p < 0.001$ ) respectively. Instead the spontaneous production of anti-inflammatory IL-10 was lower in HF: (3.79 $\pm$ 0.41) pg/10<sup>6</sup> cells vs (5.86 $\pm$ 0.76) pg/10<sup>6</sup> cells ( $p < 0.01$ ). The severity of HF was associated with increased production by monocytes/macrophages of IL-1 and IL-6 and with decreased production of IL-10.

**Conclusion.** The monocytes/macrophages in patients with ischemic HF are in condition of chronic activation which manifests of overproduction of proinflammatory cytokines and poor secretion of anti-inflammatory IL-10.

**Key words:** chronic heart failure, monocytes/macrophages, cytokine.