

**ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ИХ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO**

О.В. Ромащенко¹, С.В. Надеждин¹, Л.Р. Закирова¹, П.К. Алфёров^{1,2}, Е.Е. Казакова², Н.Б. Пилькевич¹, Н.Д. Грищенко^{1,2}, Е.К. Ветрова², И.А. Лаптева², Л.В. Стаценко², М.Г. Гладкова², Ю.А. Саввина¹, А.В. Морозова¹, Бабанина А.К.¹

¹*Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308017, г.Белгород, ул.Победы, д.85;*

²*Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа», 308007, г. Белгород, улица Некрасова, дом 8/9*

e-mail: Romashenko@bsu.edu.ru тел. 8-980-375-59-76

Резюме

С целью определения жизнеспособности лейкоцитов крови пациентов с ишемической болезнью сердца в различных условиях их культивирования in vitro было проведено исследование 33 образцов крови больных. При выполнении анализа было выделено 5 групп наблюдения: 1ю составили 30 пациентов, у которых были соблюдены все необходимые условия забора крови, отбора и транспортировки суспензии лейкоцитов, их культивирования и анализа, 2ю составил один больной, пробу которого «случайным образом» поставили инкубировать без поддержания соответствующего газового состава в термостате, 3ю составил один больной, которому «по ошибке» в лейкоцитарную суспензию была внесена питательная среда, контаминированная микробными агентами, 4ю составил один больной, у которого кровь была отобрана правильно, однако по технической причине анализ был выполнен на следующий день, т.е. анализу были подвергнуты «вчерашние» лейкоциты, простоявшие в условиях гипотермии (+4°C) в течение суток, 5ю составили 30 пациентов, которым в условиях in vitro в пробу с лейкоцитарной взвесью вносили препарат метаболического ряда цитофлавин в терапевтической концентрации.

Материалы и методы исследования. Забор крови выполнялся утром натощак в вакуумную пробирку с ЭДТА. Лейкоциты крови отбирали в асептических условиях, смешивали с питательной средой RPMI-1640 с глутамином (компания ПанЭко, Россия), помещали в лунки для исследования под микроскопом. Препараты окрашивали

флуоресцентными красителями: MitoTracker™ Red CMXRos – позволяет оценивать митохондриальный мембранный потенциал; Calcein AM – окрашивает только жизнеспособные клетки; Ethidium bromide – окрашивает только мёртвые клетки. Пробы инкубировали в течение 3х часов в CO₂ инкубаторе с 5%-ым содержанием CO₂ при температуре 37°C. Результаты оценивали методами световой и флуоресцентной микроскопии при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа и специализированного программного обеспечения. Материалы обрабатывали статистически с расчётом средних арифметических величин и их ошибок, вычислением индекса жизнеспособности лейкоцитов и определением достоверности различий по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования. У всех пациентов 1й группы наблюдения жизнеспособность клеток оставалась высокой (ИЖ=0,41±0,05) с сохранением энергообеспечивающей функции митохондрий (величина флюоресценции митохондрий составила 120,20±4,18 отн.ед.). У пациентов 2й и 3й групп наблюдения все лейкоциты оказались погибшими с разрушенными митохондриями, ввиду чего не представляется возможным определить величины флюоресценции митохондрий и индекса жизнеспособности. У пациента 4й группы наблюдения обнаружили начальные признаки разрушения лейкоцитов с нарушением энергообразующей функции митохондрий (величина флюоресценции составила 113,15±2,12 отн.ед, $p<0,05$ в сравнении с пациентами 1й группы). У пациентов 5 группы при введении цитофлавина в пробу с лейкоцитарной взвесью наблюдалось два варианта изменения жизнеспособности клеток: у 80% больных увеличение жизнеспособности лейкоцитов (ИЖ повысился с 0,02±0,01 до 0,62±0,02, $p<0,001$) и у 20% - уменьшение данного показателя (ИЖ снизился с -0,13±0,01 до -0,60±0,03 $p=0,09$), при этом величина флюоресценции митохондрий изменялась в обоих случаях в сторону увеличения, но без достижения достоверности различий; морфологически лейкоциты на фоне введения цитофлавина не изменялись, соответствовали норме.

Заключение. Исследования лейкоцитов крови человека следует проводить при соблюдении всех необходимых условий забора крови (в вакуумную пробирку утром натощак), отбора лейкоцитарной суспензии (с добавлением питательной среды исключительно в асептических условиях), их культивирования (в CO₂ инкубаторе с 5%-ым содержанием углекислого газа) и анализа (в один день забора крови). Несоблюдение любой из указанных технических процедур сопровождается нарушениями функций митохондрий с последующей их деструкцией и гибелью лейкоцитов. По данным исследования *in vitro* препарат метаболического ряда цитофлавин у пациентов с

ишемической болезнью сердца в 80% случаев способствует улучшению жизнеспособности клеток.

Ключевые слова: лейкоциты, жизнеспособность, ишемическая болезнь сердца, пациенты, микроскопия, цитофлавин, исследование in vitro

VIABILITY OF BLOOD LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE IN VARIOUS CONDITIONS OF THEIR CULTIVATION IN VITRO

O.V. Romashchenko¹, S.V. Nadezhdin¹, L.R. Zakirova¹, P.K. Alferov^{1,2}, E.E. Kazakova², N.B. Pilkevich¹, N.D. Grishchenko^{1,2}, E.K. Vetrova², I.A. Lapteva², L.V. Statsenko², M.G. Gladkova², A.V. Morozova¹, Yu.A. Savvina¹, Babanina A.K.¹

¹*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education "Belgorod State National Research University", Pobedy st., home 85, Belgorod, 308017*

²*Regional State Budgetary Institution of Health "Belgorod Regional Clinical Hospital of St. Joasaph", 308007, Belgorod, Nekrasov Street, 8/9*

Summary

In order to determine the viability of the blood leukocytes of patients with ischemic heart disease in various conditions of their cultivation in vitro, a study was conducted of 33 blood samples of patients. When performing the analysis, 4 observation groups were identified: the 1st group was consisted of 30 patients who had all the necessary conditions for blood sampling, selection and transportation of leukocyte suspension, their cultivation and analysis; the 2nd was one patient, the test of which was "randomly" incubated without maintaining the appropriate gas composition in the thermostat, the 3rd was one patient who's leukocyte suspension was "mistakenly" contaminated with microbial agents from nutrient medium; the 4th was one patient in whom the blood was collected correctly, but for technical reasons the analysis was performed the next day, i.e. yesterday's leukocytes, which stood under hypothermia (+ 4 ° C) for 24 hours, were analyzed. The 5th group consisted of 30 patients to whom a drug of metabolic series cytoflavin at a therapeutic concentration was introduced into a sample with leukocyte suspension in vitro.

Materials and research methods. Blood sampling was performed in the morning on an empty stomach into a vacuum tube with EDTA. Leukocytes of blood were collected under aseptic conditions, mixed with nutrient medium RPMI-1640 with glutamine (PanEco company, Russia),

placed in wells for examination under a microscope. The preparations were stained with fluorescent dyes: MitoTracker [™] Red CMXRos - allows to evaluate the mitochondrial membrane potential; Calcein AM - stains only viable cells; Ethidium bromide - stains only dead cells. Samples were incubated for 3 hours in a CO₂ incubator with 5% CO₂ content at 37 ° C. The results were evaluated by light and fluorescence microscopy using an inverted fluorescence microscope and specialized software. The materials were processed statistically with the calculation of arithmetic averages and their errors, the calculation of the index of viability of leukocytes and the determination of the reliability of differences by the Student's t-test.

The results of the study. In all patients of the 1st observation group, cell viability remained high (IL = 0.41 ± 0.05) with preservation of the energy supplying function of mitochondria (the fluorescence value of mitochondria was 120.20 ± 4.18 rel. units). In patients of the 2nd and 3rd observation groups, all leukocytes were killed with destroyed mitochondria, which is why it is not possible to determine the magnitude of mitochondrial fluorescence and viability index. In the patient of the 4th observation group, we found the initial signs of leukocyte destruction with impaired energy-generating function of mitochondria (the fluorescence value was 113.15 ± 2.12 rel. units, $p < 0.05$ compared with the 1st group of patients). In patients of 5th group, when cytoflavin was injected into a sample with leukocyte suspension, two variants of changes in cell viability were observed: in 80% of patients an increase in viability of leukocytes (IL increased from 0.02 ± 0.01 to 0.62 ± 0.02 , $p < 0.001$) and in 20% - a decrease in this indicator (IL decreased from -0.13 ± 0.01 to -0.60 ± 0.03 , $p = 0.09$), while the fluorescence of mitochondria changed in both cases upwards, but without achieving significant differences; morphologically, the leukocytes did not change with the introduction of cytoflavin, they corresponded to the norm.

Conclusion. Studies of human blood leukocytes should be carried out under all the necessary conditions for blood sampling (in a vacuum tube in the morning on an empty stomach), selection of a leukocyte suspension (with the addition of a nutrient medium exclusively under aseptic conditions), and their cultivation (in a CO₂ incubator with 5% carbon dioxide) and analysis (one day blood sampling). Failure to comply with any of these technical procedures is accompanied by impaired mitochondrial functions, followed by their destruction and leukocyte death. According to an in vitro study, the drug of the metabolic series cytoflavin in patients with coronary heart disease in 80% of cases helps to improve cell viability.

Key words: leukocytes, viability, coronary heart disease, patients, microscopy, cytoflavin, in vitro study

Введение

Изучение лейкоцитов очень важно в современной медицине, поскольку лейкоциты отражают внутреннее состояние организма. Это своего рода зеркало гомеостаза, по которому можно определить характер процесса, который лежит в основе болезни, его тяжесть, прогноз и эффективность терапии. Лейкоциты весьма динамичны, они быстро реагируют и очень информативны, определяются очень просто и поэтому исследование лейкоцитов обязательно в динамике болезни [1, 2].

Существуют принятые нормативы взятия анализа крови для исследования лейкоцитов. Так, согласно ГОСТ Р 53079.4-2008 [3] «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований» от 01.01.2010 «мазки крови для дифференциального подсчета лейкоцитов должны быть подготовлены не позднее, чем через 3 ч после взятия образца. При плановом назначении лабораторного теста с исследованием крови материал для его выполнения следует брать натощак (после примерно 12 ч голодания и воздержания от приема алкоголя и курения), сразу после пробуждения обследуемого (между 7-ю и 9-ю часами утра), при минимальной физической активности непосредственно перед взятием (в течение 20-30 мин), в положении пациента лежа или сидя», что предотвращает возникновение физиологических лейкоцитозов (алиментарного, эмоционального, миогенного) [4]. Большей частью данный ГОСТ строго выполняется. Однако, в реальной клинической практике иногда возникают всякие «случайности», которыми не следует пренебрегать. Настоящее исследование посвящено описанию характера изменений морфологии лейкоцитов крови пациентов с ИБС и функции митохондрий белых клеток крови при различных нарушениях технологии выполнения исследования крови. По данным обзора литературы, подобных исследований не проводилось.

Кроме того, представляет интерес возможность фармакологического влияния на состояние жизнеспособности лейкоцитов крови, особенно при состояниях, связанных с гипоксией, у пациентов с ишемической болезнью сердца. Препаратом выбора явился комплексный препарат метаболического ряда цитофлавин, который судя по механизму действия его основных компонентов (янтарная кислота, инозин, рибофлавин, никотинамид) способен активировать аэробный гликолиз, процессы клеточного дыхания и энергообразования [5]. Каким образом такой препарат может влиять на жизнеспособность клеток и величину флюоресценции митохондрий у пациентов с ишемической болезнью сердца, в отечественной и зарубежной литературе не описано.

Цель

Целью настоящего исследования явилось определение жизнеспособности и функционального состояния митохондрий лейкоцитов крови пациентов с ишемической болезнью сердца в различных условиях культивирования лейкоцитов *in vitro* – при строгом соблюдении всех требований стандартных операционных процедур, при «случайном» нарушении технологии выполнения исследования крови и в условиях фармакологического влияния (при введении в пробу с лейкоцитарной взвесью препарата метаболического ряда цитофлавина).

Материалы и методы

Нами было проведено исследование 33 образцов крови больных с ишемической болезнью сердца (ИБС): стабильной стенокардией напряжения I-III функционального класса (из исследования исключали острый коронарный синдром), поступивших в отделение кардиологии №1 Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Забор крови выполнялся утром натощак в вакуумную пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Обязательным условием отбора пациентов для исследования было отсутствие рентгеновского излучения на протяжении как минимум 21 дня до забора крови ввиду известного разрушительного действия рентгеновских лучей на лейкоциты крови человека [6] и способности белых клеток крови к полному обновлению состава на протяжении 21 дня при средней продолжительности жизни лейкоцитов 7-9 дней [7]. Лейкоциты крови отбирали в асептических условиях, смешивали с питательной средой RPMI-1640 с глутамином (компания ПанЭко, Россия), помещали в лунки 24-х луночного планшета для исследования под микроскопом. Препараты окрашивали флуоресцентными красителями: MitoTracker™ Red CMXRos (компания Invitrogen, США) – позволяет оценивать митохондриальный мембранный потенциал [8]; Calcein AM (компания Invitrogen, США) – окрашивает только жизнеспособные клетки [9]; Ethidium bromide (компания Sigma-Aldrich, США) – окрашивает только мёртвые клетки [10].

Пробы инкубировали в течение 3х часов в CO₂ инкубаторе с 5%-ым содержанием CO₂ при температуре 37°C. Результаты оценивали методами световой и флуоресцентной микроскопии при помощи инвертированного микроскопа Eclipse Ti-U (компания Nikon, Япония). Обработку полученных данных проводили с помощью специализированного программного обеспечения EZ-C1 FreeViewer Ver3.90 (компания Nikon), определяли интенсивность флуоресценции в 100 клетках в 10 полях зрения для каждой лунки - контрольной и опытной; а также проводили подсчёт количества живых и мёртвых клеток и рассчитывали индекс жизнеспособности клеток по формуле:

$$\text{ИЖ} = (\text{количество живых клеток} - \text{количество мёртвых клеток}) /$$

количество мёртвых клеток, где ИЖ – индекс жизнеспособности.

Всего нами было проанализировано 6000 клеток. Материалы обрабатывали статистически с расчётом средних арифметических величин и их ошибок, вычислением индекса жизнеспособности лейкоцитов и определением достоверности различий по t-критерию Стьюдента.

При выполнении анализа было выделено 4 группы наблюдения: 1ю составили 30 пациентов, у которых были соблюдены все необходимые условия забора крови, отбора и транспортировки суспензии лейкоцитов, их культивирования и анализа, 2ю составил один больной, пробу которого «случайным образом» поставили инкубировать без поддержания соответствующего газового состава в термостате (без подачи углекислого газа), 3ю составил один больной, которому «по ошибке» в лейкоцитарную суспензию была внесена питательная среда, контаминированная микробными агентами, 4ю составил один больной, у которого кровь была отобрана правильно, однако по технической причине анализ был выполнен на следующий день, т.е. анализу были подвергнуты «вчерашние» лейкоциты, простоявшие в холодильнике, в условиях гипотермии ($+4^{\circ}\text{C}$), в течение суток, 5ю составили 30 пациентов, которым в условиях *in vitro* в пробу с лейкоцитарной взвесью вносили препарат метаболического ряда цитофлавин в терапевтической концентрации по разработанной нами методике [11].

Результаты и их обсуждение

При анализе морфологии клеток крови пациентов 1й группы наблюдения в условиях световой микроскопии было отмечено нормальное строение и лейкоцитов и эритроцитов, попавших в поле зрения, без разрывов клеточных мембран и без явлений агглютинации (Рис.1, А.). При флуоресцентной микроскопии в лунках, окрашенных Mito Tracker Red, обнаружены чётко светящиеся клетки, круглые и оформленные, что свидетельствует о нормально функционирующих митохондриях (Рис.1, Б.). Средняя величина флюоресценции по группе составила $120,20 \pm 4,18$ отн.ед. Окраска Calcein AM показала, что все светящиеся клетки с функционирующими митохондриями – живые (Рис.1, В.). Количество мёртвых клеток было небольшим (Рис. 1, Г.) Индекс жизнеспособности лейкоцитов в среднем по группе составил $0,41 \pm 0,05$.

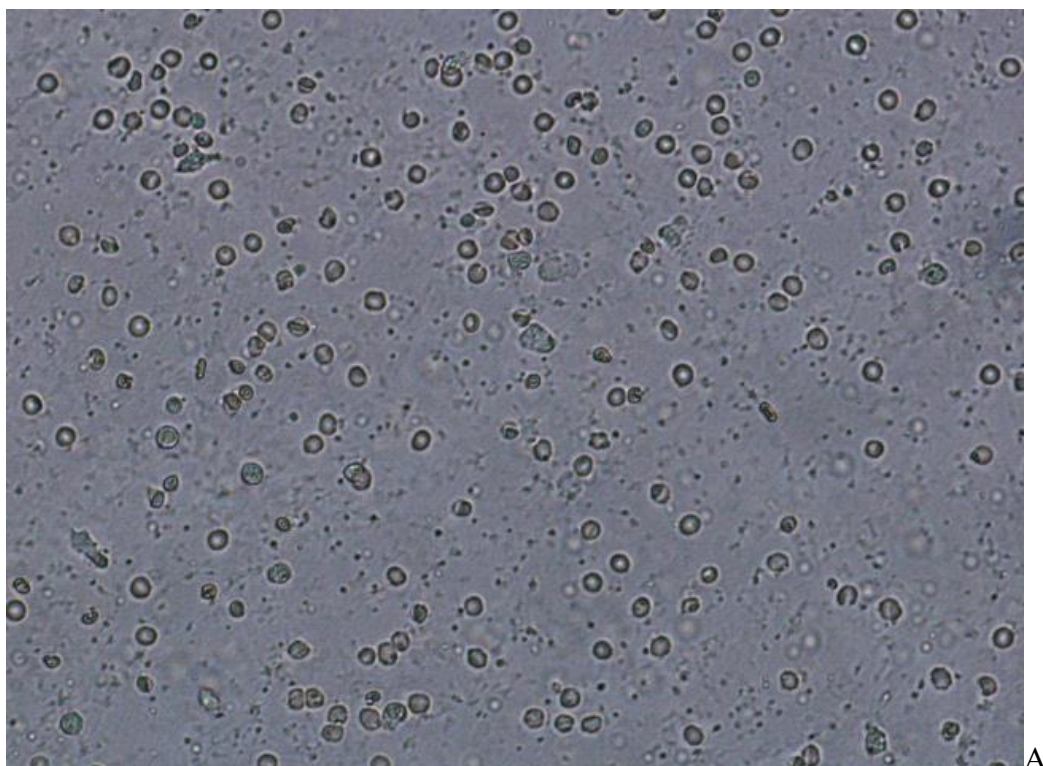


Рис. 1 Норма. А. Лейкоциты (обозначены стрелочками) и другие форменные элементы крови. Световая микроскопия, ув.Х200.

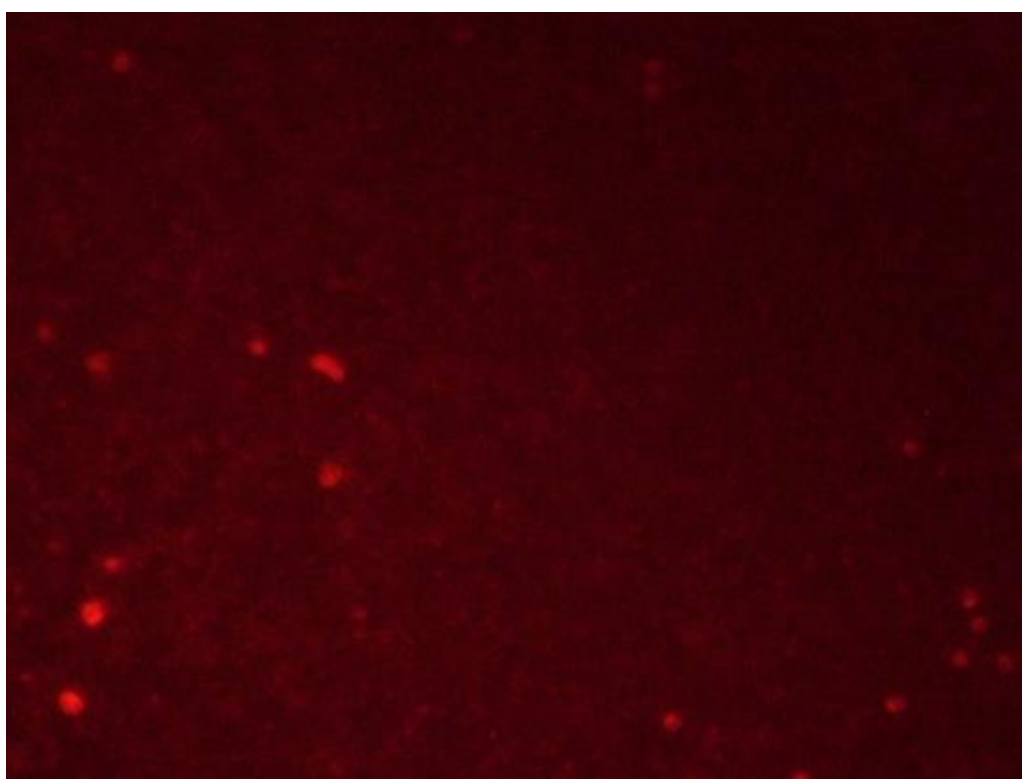


Рис.1. Норма. Б. Свечение митохондрий лейкоцитов крови (краситель - Mito Tracker Red) . Флуоресцентная микроскопия, ув.Х200.

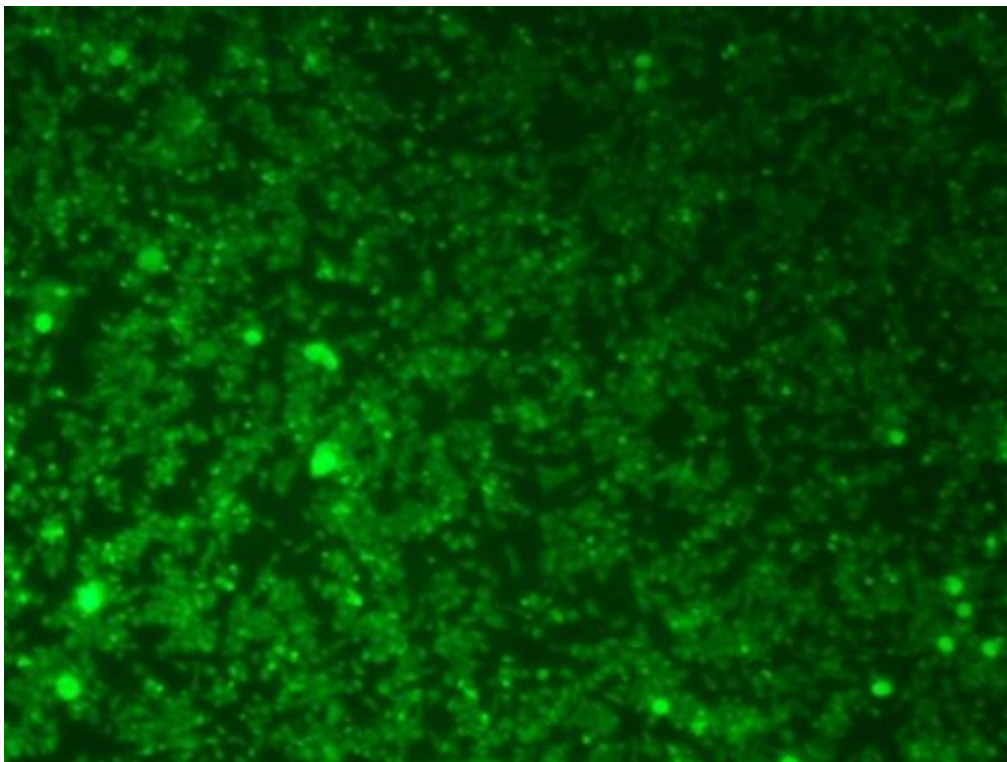


Рис.1. Норма. В. Свечение мембранных структур живых белых клеток крови (краситель - Calcein AM). Флуоресцентная микроскопия, ув.Х200.

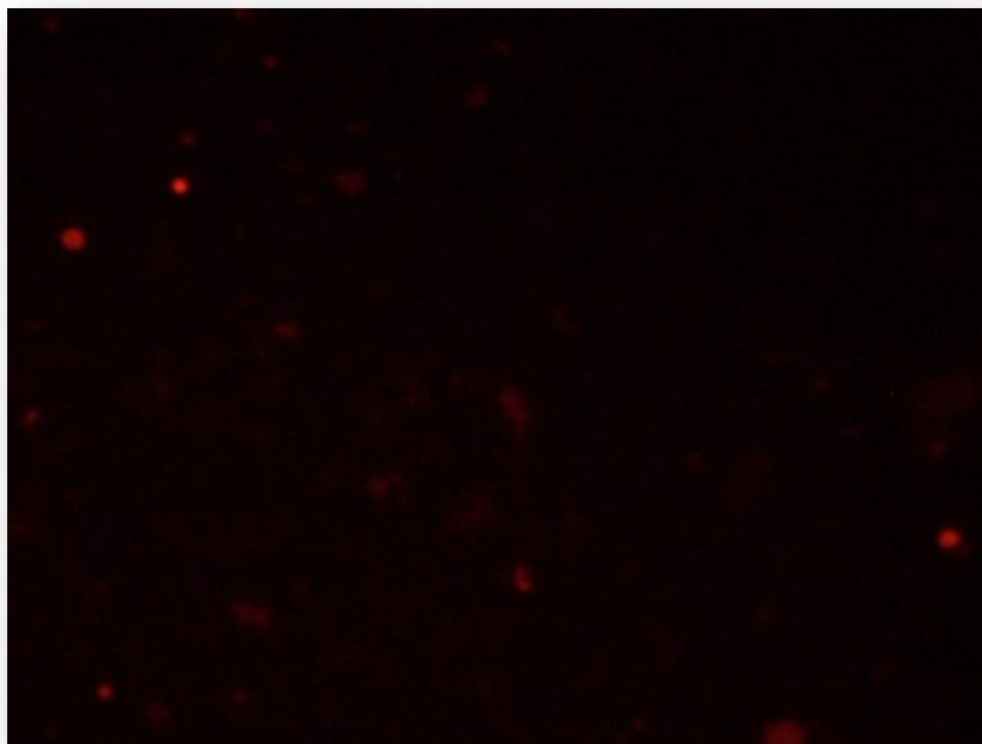


Рис.1. Норма. Г. Свечение мёртвых лейкоцитов (краситель - Ethidium bromide). Флуоресцентная микроскопия, ув.Х200.

Представленные микрофотографии на рисунках 1 (А,Б,В,Г), на наш взгляд, отражают физиологическую норму, что было получено вследствие анализа образцов крови 30 пациентов с ИБС, у которых в процессе забора крови, отбора лейкоцитарной суспензии, её транспортировки и анализа не было допущено никаких технологических ошибок.

На рисунке 2 (А) представлена световая микрофотография пациента, лейкоцитарную суспензию которого в процессе культивирования поставили в термостат без дополнительной подачи 5% углекислого газа, в результате чего через 3 часа инкубации произошел сдвиг рН в сторону закисления среды ввиду сформировавшейся гипероксии. При анализе морфологии лейкоцитов обнаружены деструктивные изменения их конфигурации, разрывы мембран клеток, а также «шиповатость» поверхности эритроцитов. При флуоресцентной микроскопии вместо сформированных округлых светящихся клеток была обнаружена «гомогенная масса», что свидетельствует о тотальном разрушении митохондрий лейкоцитов в условиях ацидоза (Рис.2, Б.). В связи с этим не представляется возможным оценить величину флюоресценции клеток и рассчитать их жизнеспособность.

Объяснением полученного результата может быть обзор отечественной и зарубежной литературы. Так, известно, что снижение рН внутри- и внеклеточной среды оказывает непосредственное цитотоксическое действие, вызывая «разрыхление» клеточных мембран, изменяя их физико-химические свойства, способствуя повышенной проницаемости и набуханию клеток [12].

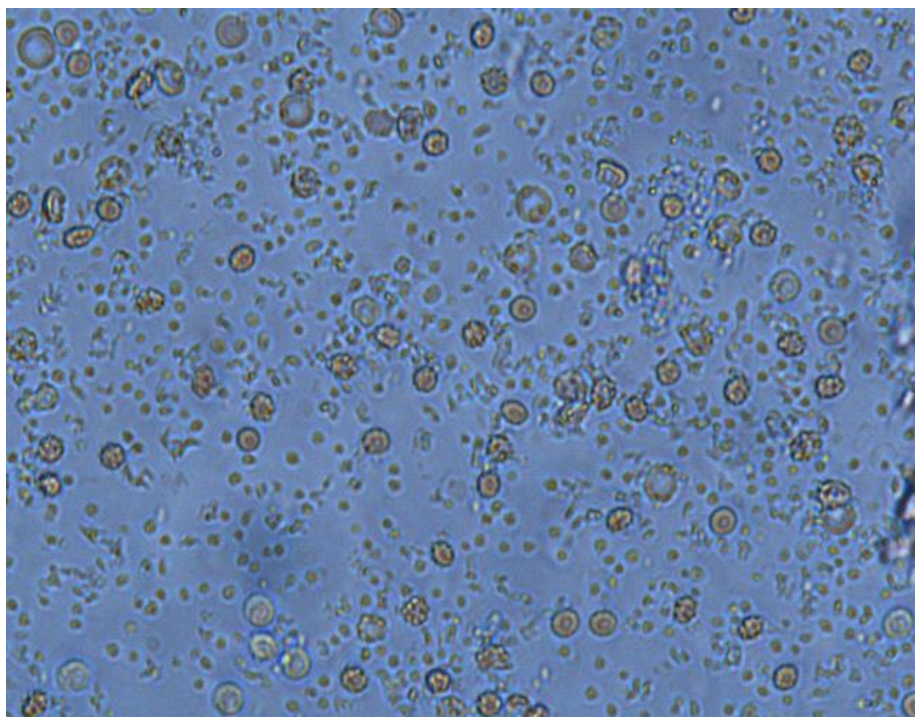


Рис. 2. Культивирование в термостате без поддержания соответствующего газового состава (закисление среды). А. Световая микрофотография образца крови (лейкоцитарной суспензии), ув.Х200.

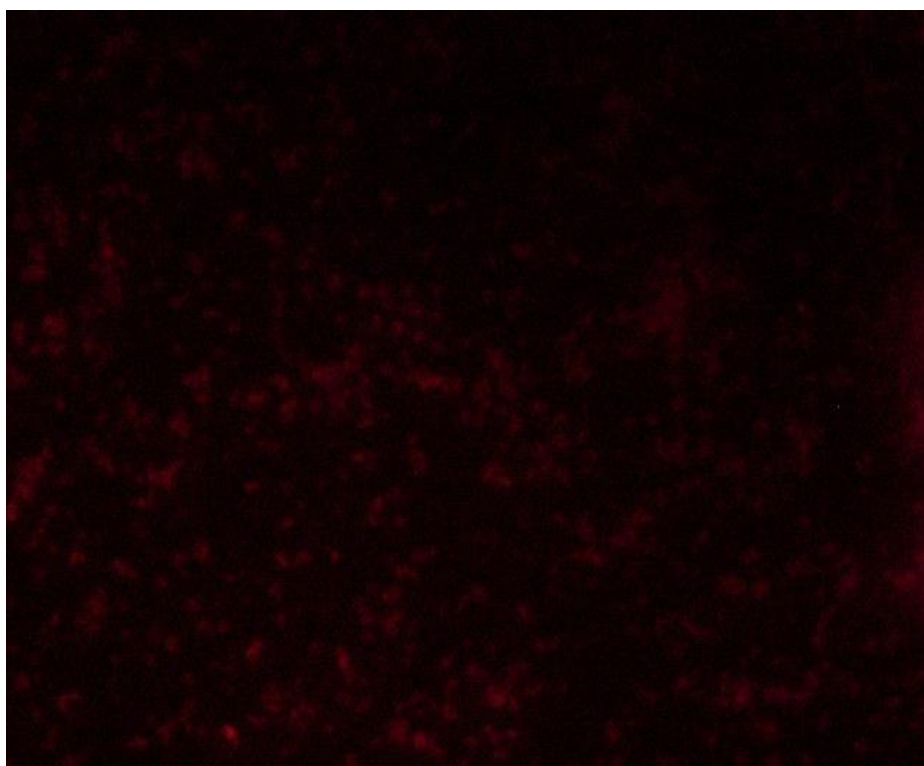


Рис. 2. Культивирование в термостате без поддержания соответствующего газового состава (закисление среды). Б. Свечение разрушенных митохондрий лейкоцитов. (краситель - Mito Tracker Red). Флуоресцентная микроскопия, ув.Х200.

Ацидоз нарушает течение многих ферментативных реакций одновременно активирует некоторые фосфолипазы (фосфолипазу A2, инициирующую повреждение мембран) и протеазы, что ведет к распаду фосфолипидов и белков и, как следствие, деструкции клеточных структур [13]. Несоблюдение методики и техники проведения нашего эксперимента привело к нарушению газового состава среды при инкубации клеток крови, что повлекло за собой их гипероксигенацию, которая вызвала генерацию избытка активных форм кислорода (АФК), перекрывающих возможность антиоксидантной системы их связывать, что приводит к повреждению клеточных мембран вследствие окисления мембранных белков, интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [14], нуклеиновых кислот, углеводов [15,16,17]. АФК, взаимодействуя ковалентно, модифицируют протеины, меняя их конформацию (пространственную форму), повышают чувствительность к действию протеолитических ферментов, осуществляя их физиологическую денатурацию [18]. В условиях окислительного стресса, вызванного АФК, в первую очередь атаке подвергаются не липиды, а белки плазматических мембран, что подтверждается наличием выраженных изменений в области анулярных липидов [19]. Химические модификации (окисление) молекул клеток несомненно ведут к изменению их нативной конформации и, как следствие, невозможности выполнения своих физиологических функций, что в свою очередь, приводит к изменению структуры плазматических мембран клеток (шиповатость!) и субклеточных структур, т.е. их дестабилизации и в дальнейшем к разрушению. Изменение структурного состояния плазматических мембран клеток, обусловленное интенсификацией ПОЛ и оксидативной модификацией мембранных белков ведет к повышению уровня экспрессии Fas-рецептора лимфоцитов и связано с демаскированием скрытых (предсуществующих) молекул CD95 [20]. В связи с чем можно предположить возможность реализации рецептор опосредованного (Fas-зависимого) пути апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия АФК [21].

На рисунке 3 представлен случай неправильной пробоподготовки, когда к лейкоцитарной суспензии «случайно» была добавлена питательная смесь, контаминированная микробными агентами. Согласно паспорта, визуальное питание среда RPMI – 1640 представляет собой прозрачную жидкость красновато-оранжевого цвета, без опалесценции и осадка, стерильная, с нормальным сроком годности. Однако, бутылка была вскрыта без соблюдения правил стерильности, указанных на упаковке. В результате, через несколько дней, несмотря на хранение данной бутылки в холодильнике, питательная смесь «протухла» - она изменила свою окраску, побледнела, помутнела и

стала издавать неприятный запах гниения. Вот такая испорченная среда была добавлена в лейкоцитарную суспензию. Через 3 часа инкубации при температуре 37⁰С с соответствующей подачей 5% углекислого газа при микроскопии мы обнаружили существенные изменения морфологии лейкоцитов (Рис.3, А). На представленном рисунке видно появление большого количества деструктивных форм лейкоцитов с разрушенными клеточными структурами, фрагментацией клеток и их агглютинацией. При флюоресцентной микроскопии вместо сформированных округлых светящихся клеток была обнаружена «гомогенная масса», что свидетельствует о тотальном разрушении митохондрий лейкоцитов крови при контаминации пробы микробными агентами (Рис.3, Б). В связи с этим не представляется возможным оценить величину флюоресценции клеток и рассчитать их жизнеспособность. Количество мёртвых лейкоцитов, собравшихся в конгломераты, было огромным (Рис.3, В.).

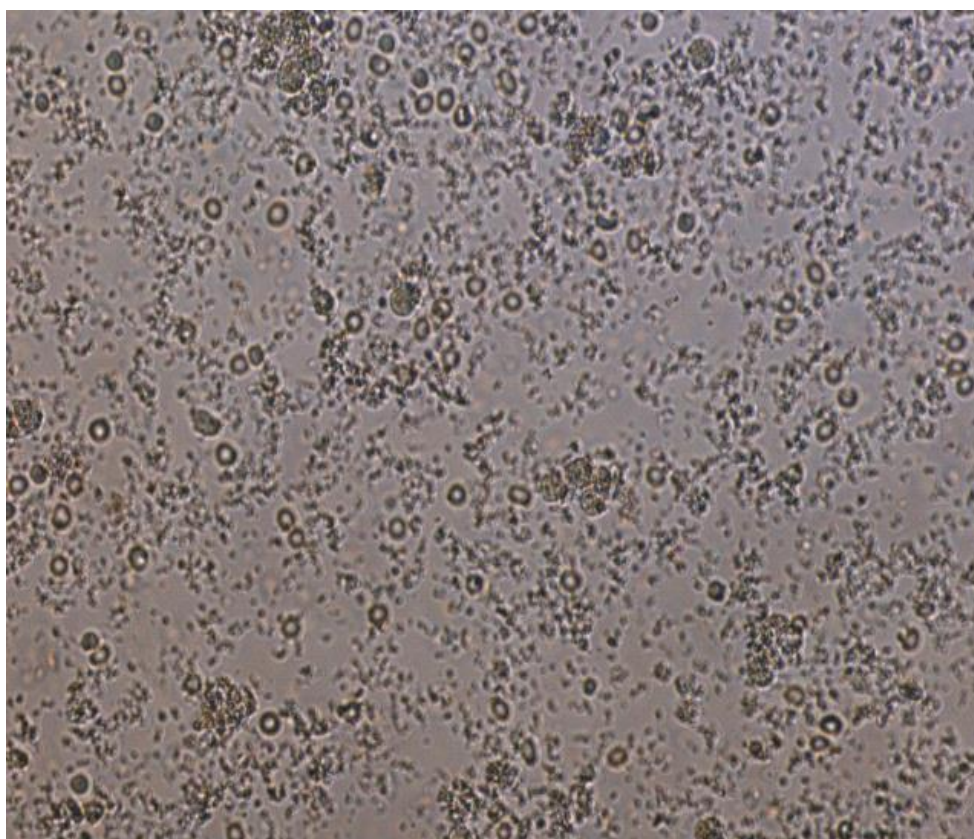


Рис. 3. Контаминация пробы микробными агентами.

А. Световая микрофотография образца крови (лейкоцитарной суспензии).

Световая микроскопия, ув.Х200.

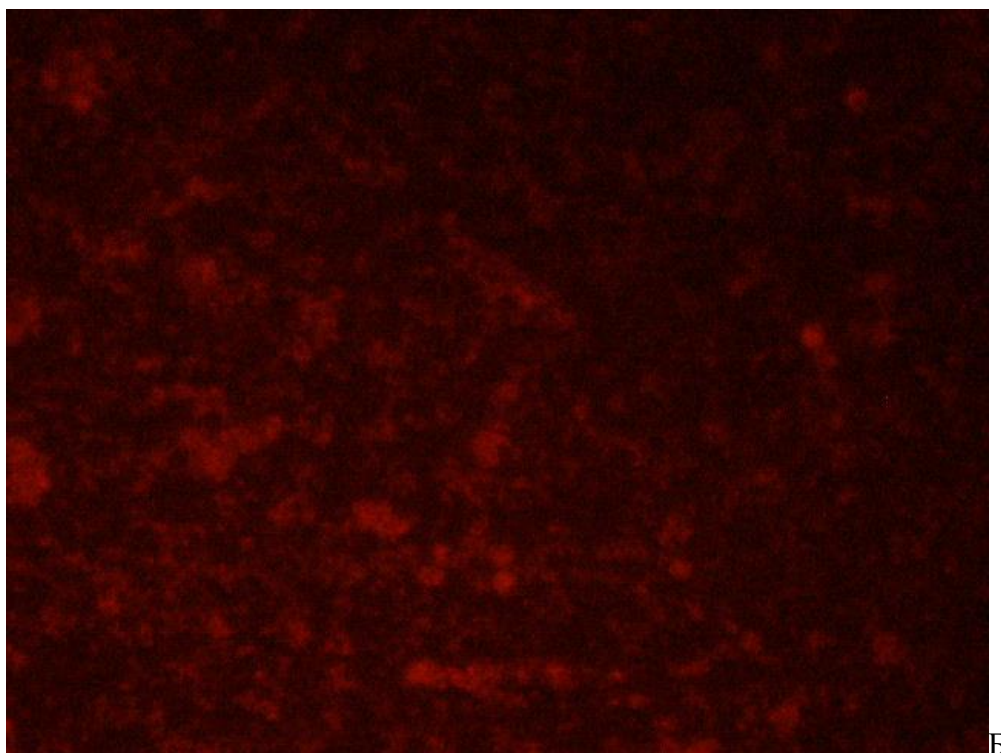


Рис. 3. Контаминация пробы микробными агентами.

Б. Свечение разрушенных митохондрий лейкоцитов. Флюоресцентная микроскопия (краситель - Mito Tracker Red), ув.Х200.

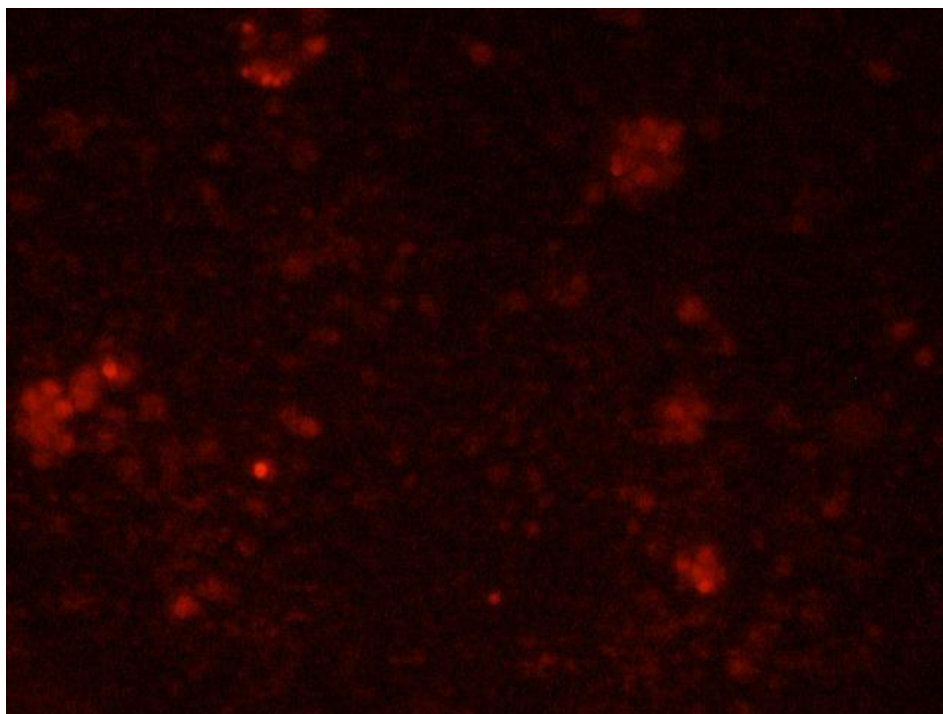


Рис. 3. Контаминация пробы микробными агентами.

В. Свечение мёртвых лейкоцитов (краситель - Ethidium bromide). Флуоресцентная микроскопия, ув.Х200.

Объяснений полученным данным может быть несколько. Во-первых, известно, что лейкоциты являются иммунокомпетентными клетками, и при попадании микроорганизмов в кровь лейкоциты начинают мигрировать к возбудителям инфекционного процесса с тем, чтобы их поглотить и уничтожить [22]. Поэтому образование конгломератов белых клеток крови, их слияние может быть связано, прежде всего, со стремлением лейкоцитов выполнить свои функциональные обязанности. Во-вторых, продуктами метаболизма целого ряда анаэробных микроорганизмов являются различные кислоты (янтарная, фумаровая, молочная, фенилпропионовая, пара-гидроксифенилпропионовая кислоты, фенилмолочная и пара-гидроксифенилмолочная кислоты), которые оказывают токсические эффекты на функцию митохондрий [23]. В-третьих, накопление кислот в питательной среде (суспензии лейкоцитов) неизбежно приводит к изменению рН - закислению. В результате происходит изменение зарядов функциональных групп белков и фосфолипидов мембран клеток и субклеточных структур, что приводит к денатурации биомолекул и потере их свойств и функций. Снижение рН среды (ацидоз), уменьшает потребление глюкозы в клетках, подавляет ее транспорт [24]. Избыток лактата оказывает ингибирующее влияние на фосфофруктокиназу и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, что тормозит гликолиз, разобщает дыхание и фосфорилирование [25]. Ацидоз индуцирует освобождение из внутриклеточных мембран и накопление в цитоплазме ионов кальция, которые транспортируются в митохондрии и, в свою очередь также, ингибируют окислительное фосфорилирование [26].

На рисунке 4 представлен случай выполнения анализа спустя 24 часа после правильно выполненного забора крови с хранением биоматериала в вакуумной пробирке с ЭДТА в условиях гипотермии при 4⁰С. На световой микрофотографии данного образца крови представлены, большей частью, нормально сформированные лейкоциты и попавшие в поле зрения эритроциты, иногда прослеживается небольшое количество клеток с признаками деструкции мембранных структур (Рис.4, А). По данным флуоресцентной микроскопии есть митохондрии с сохраненной структурой и небольшое количество с признаками разрушения (рис. 3, Б). и нарушением энергообразующей функции митохондрий (величина флюоресценции составила 113,15±2,12 отн.ед, p<0,05 в сравнении с пациентами 1й группы).

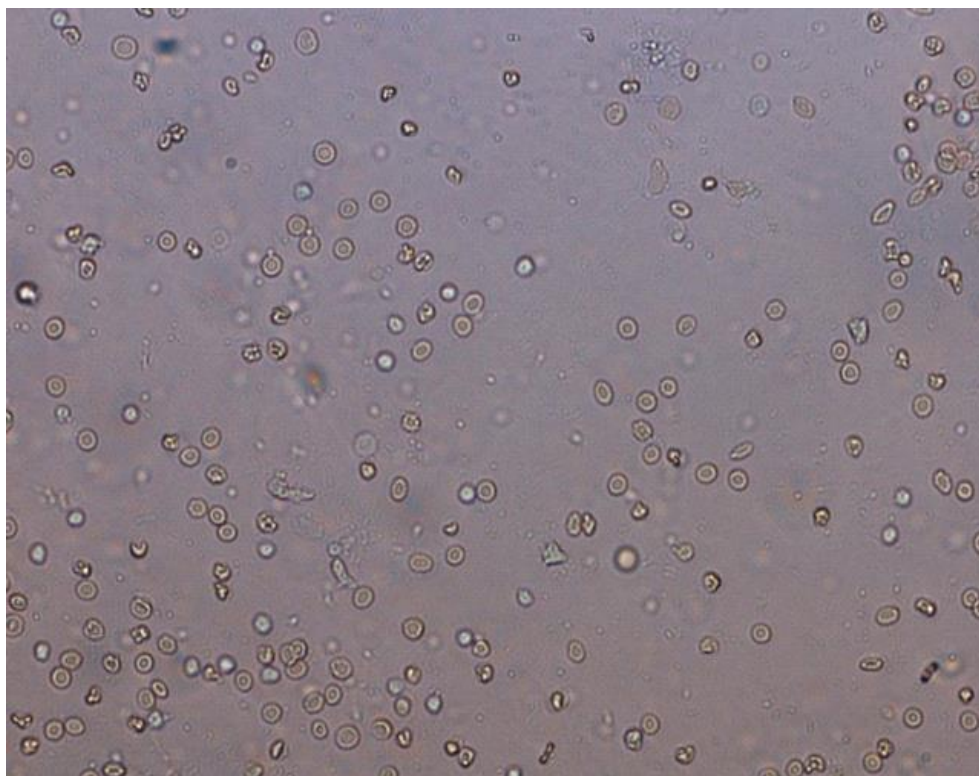


Рисунок 4. «Вчерашняя» кровь (лейкоцитарная суспензия). Световая микроскопия, ув.Х200.

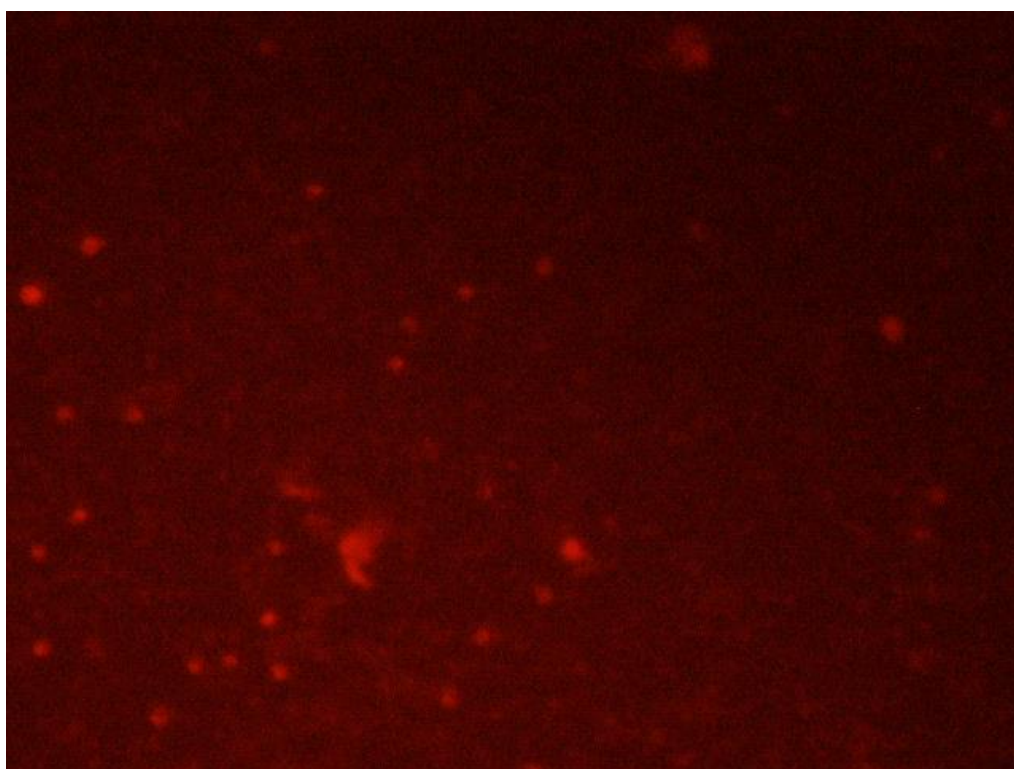


Рисунок 4. «Вчерашняя кровь». Б.Свечение митохондрий лейкоцитов (краситель - Mito Tracker Red). Флуоресцентная микроскопия, ув.Х200.

При хранении лейкоцитов при +4°C процессы деструкции начинают развиваться

уже в первые сутки хранения [27]. Синтез белка в клетках млекопитающих при температурах ниже 10°C останавливается, т.к. наблюдается сильное ингибирование ферментативных процессов из-за наличия высоких энергий активаций [28]. В условиях гипотермии клетки подвергаются воздействию комплекса повреждающих факторов, среди которых существенное значение имеют избыточная дегидратация и фазовые превращения биополимеров и надмолекулярных структур, изменение величины pH и зарядовых характеристик мембран [29], что приводит к уменьшению объема и деформации клеток. Значительные перестройки мембранных структур клеток инициируются следующими факторами, имеющими место при гипотермии: 1) фазово-структурные превращения "аннулярных" липидов; 2) ослабление гидрофобных взаимодействий биомолекул в мембране; 3) гипоксия, связанная с нарушением транспорта, доставки и утилизации кислорода и метаболитов, поддерживающих нормальный уровень жизнедеятельности клетки. Выраженность этих изменений зависит от времени экспонирования объекта в зоне холодового воздействия [30]. В первую очередь страдает жизнеспособность лейкоцитов, в частности, гранулоцитов – более сложно устроенных клеток крови с высоким уровнем метаболизма. Показано, что при хранении в течение 48 часов в этих клетках происходит уплотнение ядерной мембраны, частичный лизис митохондрий, вакуолизация цитоплазмы [31,32]. При кратковременной (<2ч) холодовой экспозиции (ниже 10°C) не наблюдается значительного изменения в общем синтезе белка после возврата к более высоким температурам [33]. Однако более длительная холодовая экспозиция приводит к выработке целого диапазона белков теплового шока (БТШ) [34] и повышению экспрессии мРНК для БТШ 70 [35].

Для оценки возможности фармакологического влияния препарата метаболического ряда цитофлавина на жизнеспособность лейкоцитов крови пациентов с ишемической болезнью сердца мы провели анализ проб 1й группы пациентов, где были соблюдены все технологические нормативы, с дополнительным введением цитофлавина *in vitro* в терапевтической концентрации. Обнаружили два варианта реагирования клеток на введение препарата, активирующего аэробный гликолиз: повышение их жизнеспособности (у 80% больных) и снижение данного показателя (у 20% больных), причём характер реагирования клеток зависел от исходного состояния жизнеспособности – при исходно положительном индексе жизнеспособности (когда количество живых клеток преобладает над количеством мёртвых) дополнительное введение цитофлавина способствовало улучшению данного показателя, тогда как при исходно отрицательном индексе жизнеспособности (когда количество мёртвых клеток преобладало над

количеством живых) дополнительное введение цитофлавина ассоциировалось с ухудшением данного показателя (рис. 5). Величина флюоресценции митохондрий изменялась недостоверно, в сторону увеличения в обеих группах.

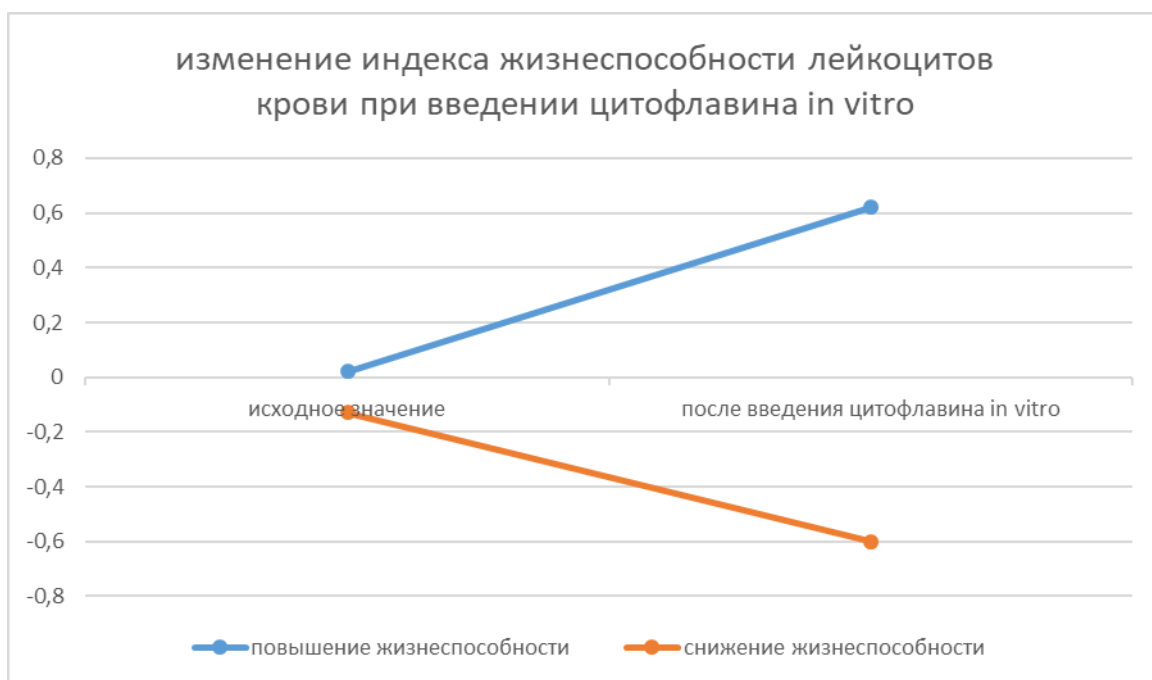


Рисунок 5. Изменение индекса жизнеспособности лейкоцитов крови пациентов с ИБС при введении цитофлавина in vitro.

Примечание. Достоверность различий $p < 0,001$ между исходным значением и таким же показателем после введения цитофлавина в группе повышения жизнеспособности, #достоверность различий $p < 0,1$ между исходным значением и таким же показателем после введения цитофлавина в группе понижения жизнеспособности клеток.

По всей видимости, повышение жизнеспособности клеток под влиянием препарата, активирующего аэробный гликолиз, возможно при условии сохранения их жизненного ресурса в исходном состоянии. В наших предыдущих исследованиях было показано, что цитопротекторное свойство цитофлавина у пациентов с ИБС (по данным исследования in vitro) проявляется при условии отсутствия повреждений в генотипе по ряду генов, ответственных за нормальное состояние эндотелия сосудов как важного фактора обеспечения адекватной доставки кислорода к тканям [36,37].

Заключение

Таким образом, наше наблюдение показало, что исследования лейкоцитов крови человека следует проводить при соблюдении всех необходимых условий забора крови (в вакуумную пробирку утром натощак), отбора лейкоцитарной суспензии (с добавлением питательной среды исключительно в асептических условиях), их культивирования (в CO₂ инкубаторе с 5%-ым содержанием углекислого газа) и анализа (в один день забора крови). Несоблюдение любой из указанных технических процедур сопровождается нарушениями функций митохондрий с последующей их деструкцией и гибелью лейкоцитов. Препарат метаболического типа действия цитофлавин способен улучшать жизнеспособность лейкоцитов крови при условии сохранения их жизненного ресурса в исходном состоянии.

Выводы

1. При соблюдении всех необходимых технологических процедур по забору образцов крови, отбору лейкоцитов, их хранения и анализа согласно ГОСТ Р 53079.4-2008 белые клетки крови сохраняют высокую жизнеспособность и митохондриальную активность.
2. В случае отсутствия поддержания должного газового состава в термостате при инкубации лейкоцитов (подачи углекислого газа) возникает явление гипероксии в пробах с развитием ацидоза, деструкцией митохондрий и самих лейкоцитов.
3. В случае несоблюдения правил асептики при вскрытии и хранении питательной среды для культивирования лейкоцитов, пробы контаминируются микробными агентами, что приводит к полной деструкции митохондрий, склеиванию лейкоцитов между собой и их гибели.
4. В случае проведения исследования лейкоцитов на второй день после забора крови ввиду хранения пробы в условиях гипотермии наблюдаются начальные признаки разрушения лейкоцитов и их митохондрий.
5. Введение цитофлавина в нормально подготовленные пробы с лейкоцитарной суспензией *in vitro* у пациентов с ишемической болезнью сердца приводит к повышению жизнеспособности клеток (в 80% случаев) при условии сохранения их жизненного ресурса в исходном состоянии.

Литература

1. Степанова, Е. С. Влияние переохлаждения на функциональную активность лейкоцитов /Е.С. Степанова: диссертация ... к. б. н., 2010. - 125с.
2. Воробьева, О. В. Апоптоз и некроз лимфоцитов периферической крови у недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом и бактериальной инфекцией /О.В. Воробьева //Запорожский медицинский журнал. – 2008. – Т.2, №1. – С.34-36.
3. ГОСТ Р 53079.4-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200072566>, свободный.
4. Козлов, В.А. Иммунная система и физические нагрузки /В.А. Козлов, О.Т. Кудаева // Медицинская иммунология. – 2002. - Т. 4, № 3. - С. 427-438.
5. Ливанов, Г.А. Сравнительная оценка влияния налоксона и метаболического антигипоксанта цитофлавина на клиническое течение и динамику показателей кислородотранспортных систем у больных с острыми тяжелыми отравлениями метадоном /Г.А. Ливанов, А.Т. Лоладзе, А.Н. Лодягин, Б. В. Батоцыренов, Д. В. Баранов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т.80, №6. – С.30-33.
6. Кузнецова, Е.А. Индукция редко- и плотноионизирующими излучениями повреждений ДНК в лейкоцитах крови и цитогенетических повреждений в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей и их потомков /Е.А. Кузнецова, С.И. Заичкина, Н.П. Сирота, С.А. Абдуллаев, О.М. Розанова, Г.Ф. Аптикаева, С.С. Сорокина, С.П. Романченко, Е.Н. Смирнова //Радиационная биология. Радиоэкология. - 2014. – Т.54, №4. – С.341-349.
7. Brubaker, L.H. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria /L.H. Brubaker, L.J. Essig, C.E. Mengel //Blood. – 1977. – Vol.50. – P.657–662.
8. Головкин, А.С. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии /А.С.Головкин, А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев // Медицинская иммунология. - 2012. - Т. 14, № 6. - С. 461-482.
9. Бибикова, М.В. Олигомицины SCII и В подавляют пролиферацию и вызывают гибель клеток лимфолейкоза P388 и штамма, устойчивого к винкристину /М.В. Бибикова, Н.Э. Грамматикова, А.В. Катлинский, А.Ф. Корыстова, Л.Н. Кублик,

- М.Х. Левитман, В.В. Шапошникова, Ю.Н. Корыстов // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. - 2015. - Т. 32, № 2. - С. 135.
10. Ларионов, П.М. Изменение спектра лазерно-индуцированной флуоресценции ткани миокарда по мере снижения ее жизнеспособности /П.М. Ларионов, А.Н. Малов, М.М. Мандрик, Н.А. Маслов, А.М. Оришич //Журнал прикладной спектроскопии. - 2003. - Т. 70, № 1. - С. 38-42.
11. Ромащенко, О.В. Способ определения индивидуальной реактивности митохондрий человека под действием препаратов метаболического ряда в пробах in vitro /О.В. Ромащенко // Патент РФ №2578436. – 2016.
12. Ginsberg, M.D. New Strategies to Prevent Neural Damage from Ischemic Stroke / M.D. Ginsberg. – 1994. – 34 p.
13. Микаелян, Н.П. Аденозинтрифосфат крови и активность инсулиновых рецепторов при сахарном диабете у детей /Н.П. Микаелян, А.Е. Гурина, А.В. Микаелян // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». - 2011. - Т.13, №3. - С. 369.
14. Vileno, B. Evidence of lipid peroxidation and protein phosphorylation in cells upon oxidative stress photo-generated by fullerenes / B. Vileno, S. Jeney, A. Sienkiewicz, et al.// Biophys. Chem. – 2010. – Vol.152 (1–3). – P.164–169.
15. Балаболкин, М.И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2002. - №4. – С.5-16.
16. Контрощикова, К.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патологии / К.Н. Контрощикова. - Н. Новгород, 2000. - 23 с.
17. Балаболкин, М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Кремская: руководство для врачей. - М.: Медицина, 2005. - 512 с.
18. Титов, В.Н. Регуляция перекисного окисления in vivo как этапа воспаления. Олеиновая кислота, захватчики активных форм кислорода и антиоксиданты / В.Н. Титов, Д.М. Лисицын // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. - №6. – С.3—12.
19. Губский, Ю.И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий, С.И. Коваленко, С.В. Павлов, О.В. Ганчева, А.Н. Марченко // Журнал АМН України. – 2008. – Т.814, №7. – С.49—54.

20. Рощупкин, Д.И. Основы фотобиофизики / Д.И. Рощупкин, В.Г. Артюхов. - Воронеж: ВГУ, 1997. - 116 с.
21. Артюхов, В.Г. Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного УФ-светом и активными формами кислорода / В.Г. Артюхов, М.С. Трубицына, М.А. Наквасина, Е.В. Соловьева, О.В. Лидохова // Радиационная биология. Радиоз экология. - 2011. - Т.51, №4. - С. 425-443.
22. Шмелёва, Е.В. Иммунокомпетентные клетки как мишень для терапии хронического гепатита С / Е.В. Шмелёва, Н.Д. Ющук, О.Ф. Ерёмина, И.П. Балмасова, Е.С. Малова, О.С. Нагаева // Лечащий врач. - 2011. - № 4. - С. 62.
23. Fedotcheva, N.I. Toxic effects of microbial phenolic acids on the functions of mitochondria / N.I. Fedotcheva, R.E. Kazakov, M.N. Kondrashova, N.V. Beloborodova // Toxicol. Lett. – 2008. - Vol. 180. – P. 182-188.
24. Kayser, B. Lactate during exercise at high altitude / B. Kayser // Eur. J. Appl. Physiol. – 1996. –Vol. 74, No3. – P. 195-205.
25. Кашуро, В.А. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их фармакотерапии / В.А. Кашуро, В.Б. Долго-Сабуров, В.А. Башарин, Е.Ю. Бонитенко, Н.В. Лапина // WWW.MEDLINE.RU. – 2010. - Т.11. (ФАРМАКОЛОГИЯ) - С.611-634.
26. Аксенцев, С.Л. Кальций, освобождаемый из внутриклеточных депо, ингибирует окислительное фосфорилирование митохондрий в синапсосомах мозга крыс при ацидозе / С.Л. Аксенцев, А.В. Левко, С.В. Федорович, С.Н. Орлов и др. // Биофизика. – 1998. – Т. 43, Вып. 2. – С. 315-318.
27. Румянцев, А. Г. Клиническая трансфузиология/А. Г. Румянцев, О. А. Аграненко.— М.: ГЭОТАР «Медицина», 1998.— 575 с.
28. Craig, N. Regulation of translation in rabbit reticulocytes and mouse L-cells; comparison of the effects of temperature / N. Craig // J. Cell Physiol.— 1975.— Vol.87, N2.— P. 157-166.
29. Сведенцов, Е.П. Сохранение лейкоцитов в условиях околонулевых температур / Е.П. Сведенцов, О.О. Зайцева, Д.С. Лаптев, О.Н. Соломина, А.Н. Худяков, Т.В. Полежаева // Физиология человека. – 2010. - №3. - С.130-134.
30. Белоус, А.М. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении / А.М. Белоус, В.А. Бондаренко. Киев: Наукова думка, 1982. - 256 с.
31. Мовшев, Б.Е. Трансфузионные среды: перспективы / Б.Е. Мовшев, В.М. Витвицкий, И.Л. Лисовская, Ф.И. Атауллаханов // Новое в трансфузиологии. - 2001. - №28. - С. 38.

32. Румянцев, А.Г. Клиническая трансфузиология / А.Г. Румянцев, О.А. Аграненко. - М.: ГЭОТАР Медиа, 1998. - 575 с.
33. Фуллер, Б. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих / Б. Фуллер, К. Грин, В. И. Грищенко // Проблемы криобиологии. - 2004. - № 3. - С. 58-71.
34. Liu, A.Y. Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37 degrees C in human cells / A.Y. Liu, H. Bian, L.E. Huang, Y.K. Lee // J. Biol. Chem. - 1994. - Vol. 269, N20.- P. 14768-14775.
35. Laios, E. Characterization of coldinduced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes / E. Laios, I.M. Rebeyka, C. Prody // Mol. Cell. Biochem.- 1997.- Vol.173, N1-2.- P. 153-159.
36. Ромащенко, О.В. Влияние цитофлавина на ДНК лейкоцитов крови пациентов с ишемической болезнью сердца в зависимости от наличия полиморфизма гена эндотелиальной синтазы окиси азота/ О.В. Ромащенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2018. - Т.81, №6. - С.14-19.
37. Ромащенко, О.В. Влияние цитофлавина на апоптоз лейкоцитов крови пациентов с ишемической болезнью сердца в зависимости от носительства полиморфизма гена цитохрома CYP 2C9 в условиях in vitro/ О.В. Ромащенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2019. - Т.82, №1. - С.16-21.