

# Вміст інтерлейкіну-10 в супернатантах імуноткомпетентних клітин у хворих з різними формами ішемічної хвороби серця

Н.О. Рижкова<sup>1</sup>, Т.І. Гавриленко<sup>1</sup>, Л.В. Якушко<sup>1</sup>, О.М. Пархоменко<sup>1</sup>, Н.В. Довгань<sup>1</sup>, О.В. Довгань<sup>1</sup>, О.М. Ломаковський<sup>1</sup>, Ю.І. Бабчук<sup>2</sup>, С.М. Бабій<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ДУ Національний науковий центр «Інститут кардіології ім. академіка М.Д. Стражеска» Національної академії медичних наук України, Київ;

<sup>2</sup> Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; e-mail: tala.ruzh@gmail.com

*Обстежено 198 пацієнтів з ішемічною хворобою серця (стабільна та нестабільна стенокардія, гострий інфаркт міокарда). Вміст інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) в супернатантах імуноткомпетентних клітин визначали при їх госпіталізації, а у хворих з нестабільною стенокардією та інфарктом міокарда також на 7-му добу лікування. Виявлено широкий розкид показників при надходженні пацієнтів з гострим коронарним синдромом у стаціонар. У зв'язку з тим обстежені особи були розділені на 2 підгрупи: А – з низьким вмістом ІЛ-10 в мононуклеарах, Б – з нормальним або високим вмістом цього цитокіну. В динаміці лікування показники в мононуклеарах змінюються залежно від вихідного значення концентрації ІЛ-10 – низький вміст підвищується, високий – знижується. При цьому до 7-ї доби лікування вміст досліджуваного фактора став практично однаковим у всіх хворих. Низький вміст протизапального цитокіну ІЛ-10 на початку захворювання, ймовірно, є патогенетичною ланкою і предиктором розвитку гострих коронарних подій.*

*Ключові слова: ішемічна хвороба серця; імуноткомпетентні клітини; цитокіни; інтерлейкін-10.*

## ВСТУП

Інтерлейкін-10 (ІЛ-10) відносять до проти-запальних цитокінів, що контролюють дію прозапальних цитокінів. При ішемічній хворобі серця (ІХС) він здатний модулювати численні клітинні процеси, які відіграють важливу роль у виникненні, прогресуванні та стабілізації атеросклеротичної бляшки, а також в регуляції метаболізму холестерину в макрофагах [1, 2]. ІЛ-10 гальмує вивільнення лізосомальних ферментів нейтрофілами і моноцитами, продукцію ними метало-протеїназ, синтез прозапальних цитокінів (фактора некрозу пухлин  $\alpha$  – ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1, ІЛ-6) і хемокінів, порушуючи транслокацію транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B. Цей цитокін здатний значно пригнічувати продукти окиснення, посилювати синтез NO активованими макрофагами, посилювати експресію

рецептора для фактора активації тромбоцитів нейтрофілами і моноцитами, перешкоджає програмованій загибелі клітин – апоптозу, сприяє зростанню і диференціюванню моноцитів у макрофаги [3]. Експресія ІЛ-10 ідентифікована як на ранніх стадіях атерогенезу, так і в прогресуючій бляшці людини, де він здатний обмежувати локальні запальні реакції [4]. ІЛ-10 секретується переважно макрофагами, хоча і інші клітини, такі як лімфоцити, нейтрофіли, еозинофіли, гладкі і дендритні клітини є джерелом цього чинника. Здебільшого, концентрацію ІЛ-10 визначали в сироватці крові. Разом з тим вміст його в імуноткомпетентних клітинах, що характеризує ступінь їх активації і участь в патогенезі патологічного процесу, вивчено недостатньо.

Мета нашої роботи – вивчення продукції ІЛ-10 імуноткомпетентними клітинами периферичної крові (мононуклеарами і нейтро-

© Н.О. Рижкова, Т.І. Гавриленко, Л.В. Якушко, О.М. Пархоменко, Н.В. Довгань, О.В. Довгань, О.М. Ломаковський, Ю.І. Бабчук, С.М. Бабій

філами) у хворих з різними формами ІХС.

## МЕТОДИКА

Обстеження пацієнтів проводили в відділі імунології ДУ ННЦ «Інститут кардіології ім. акад. М.Д. Стражеска» НАМН України із дотриманням норм біоетики. Всі вони були проінформовані про діагноз, методи діагностики, лікування та профілактики, що відображено у підписаних ними інформованих згодах. Обстежено 198 пацієнтів з ІХС, серед яких 80 чоловік зі стабільною стенокардією (СС), 43 – з нестабільною стенокардією (НС) і 75 – з гострим інфарктом міокарда (ГІМ). Група контролю включала 30 практично здорових осіб, порівнянних за статтю, віком і масою з групою обстежуваних хворих. Продукцію ІЛ-10 імункомпетентними клітинами периферичної крові у пацієнтів визначали при їх госпіталізації, а у хворих з НС і ГІМ також на 7-му добу лікування. Для отримання супернатантів периферичну кров для виділення клітин забирали з ліктьової вени в пробірку, що містив гепарин у кінцевій концентрації 25 Од/мл крові, відстоювали 40–60 хв при кімнатній температурі для чіткого поділу еритроцитів і плазми. Відібрану плазму крові розводили живильним середовищем 199 в співвідношенні 1:1, повільно на шарувували по стінці пробірки на подвійний градієнт щільності (1,076 і 1,120 г/мл) і центрифугували 30 хв при 1500 об/хв. Фракцію мононуклеарів, яка складається з лімфоцитів і моноцитів і утворюється у вигляді кільця у верхній інтерфазі, відокремлювали і двічі відмивали живильним середовищем 199, використовуючи центрифугування 5 хв при 1500 об/хв. До отриманого осаду додавали 1 мл живильного середовища, підраховували кількість клітин у камері Горяєва і розводили до стандартної концентрації  $1 \cdot 10^6$  клітин/мл. Аналогічно збирали фракцію нейтрофілів, яка утворюється у вигляді кільця в нижній інтерфазі. Для культивування клітин готували живильне середовище, на основі

середовища 199, що містить 10% ембріональної телячої сироватки і гентаміцин у концентрації 80 мкг/мл. Клітини інкубували 24 год при 37°C, потім центрифугували, відбирали супернатант, який зберігали при –20°C. Концентрацію ІЛ-10 в супернатантах клітин визначали методом імунферментного аналізу (ІФА) з використанням набору реагентів «eBioscience» (Австрія). Результати ІФА аналізували на планшетному фотометрі iEMS-reader («Labsystems», Фінляндія). Абсолютну кількість клітинних популяцій визначали підрахунком формених елементів крові на апараті «Advia» (Австрія). Перераховували значення в абсолютну кількість відповідно до формули крові (кількість лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів).

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики і програми Microsoft Excel. Їх представлено в таблицях як середнє значення  $\pm$  помилка середньої арифметичної ( $M \pm m$ ). Відмінності між вибірками групами вважали вірогідними при значенні  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Концентрацію ІЛ-10, визначену в супернатантах мононуклеарів і нейтрофілів периферичної крові, представлено в табл. 1. Отримані результати свідчать про підвищений вміст цього цитокіну в мононуклеарах хворих на СС і НС. У хворих на ГІМ при госпіталізації і у практично здорових осіб не було статистично значущих відмінностей. Вміст ІЛ-10 в нейтрофілах був достовірно вищим у пацієнтів всіх груп, особливо у осіб з СС.

Низький вміст ІЛ-10 в плазмі крові традиційно реєструють при активації запалення, наявності оксидативного стресу та апоптозу пінистих клітин, що призводить до дестабілізації атеросклеротичної бляшки, формуванню тромбу і розвитку ГІМ. Однак є і такі дані, що з самого початку високий вміст ІЛ-10 в плазмі крові також негативно впливає на патологічний процес і є незалежним предиктором серцево-судинних

Таблиця 1. Концентрація інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) в супернатантах клітин у пацієнтів із ішемічною хворобою серця

Показники	Донори (n = 30)	Стабільна стенокардія (n = 80)	Нестабільна стенокардія (n = 43)	Гострий інфаркт міокарда (n = 75)
ІЛ-10, пг/мл				
в мононуклеарах	104,7 ± 23,3	306,2 ± 26,6*	238,1 ± 41,8*	154,7 ± 29,0
в нейтрофілах	1,6 ± 0,3	66,2 ± 11,1*	17,4 ± 4,6*	12,0 ± 3,1*
Абсолютні показники, ·10 <sup>9</sup> /л				
лейкоцити	5,4 ± 0,2	6,4 ± 0,1*	7,7 ± 0,3*	11,7 ± 0,3*
лімфоцити	1,8 ± 0,07	2,0 ± 0,04	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,05
моноцити	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,01*	0,4 ± 0,02*	0,5 ± 0,02*
нейтрофіли	3,2 ± 0,1	3,9 ± 0,1	5,4 ± 0,3*	9,3 ± 0,2*
ІЛ-10, пг · 10 <sup>9</sup> /л				
в мононуклеарах	187,3 ± 42,3	486,3 ± 61,4*	533,1 ± 111,8*	392,0 ± 49,9*
в нейтрофілах	5,1 ± 0,9	153,8 ± 39,2*	123,1 ± 30,1*	110,3 ± 45,3*

\*P &lt; 0,05 щодо значень у донорів.

ускладнень при ГІМ [5]. При цьому зазвичай не враховується накопичення ІЛ-10 в самих клітинах і неправильно інтерпретується його зростання при ускладненнях ІХС при можливій наявності функціональної або вродженої неспроможності протизапальної системи. Функціональна активність індивідуальної клітини не відображає поведінки популяції в цілому, з іншого боку, функціональна активність популяції нічого не говорить про таку індивідуальної клітини всередині популяції. Тільки поєднання цих двох підходів до дослідження функції клітин дає змогу адекватно оцінити поведінку популяції. У зв'язку з цим і з огляду на той факт, що у досліджуваних груп пацієнтів була різна кількість формених елементів, ми перерахували вміст ІЛ-10 на абсолютну кількість клітин, відповідно до формули крові. При такому перерахунку вміст ІЛ-10 був високим і практично однаковим у пацієнтів усіх груп як в мононуклеарах, так і в нейтрофілах. Підвищення числа лейкоцитів може бути направлено на кількісну компенсацію якісної недостатності клітин, потрібну для досягнення адекватної протизапальної відповіді.

При більш детальному розгляді отриманих результатів виявлено широкий розкид значень ІЛ-10 в мононуклеарах периферичної крові пацієнтів з НС (0,1–1435,5 пг/мл) і ГІМ (0,1–1123,4 пг/мл) при надходженні до стаціонару. При цьому вміст цитокіну був або низьким (більша частина обстежених – НС-58,1%, ГІМ – 75,4%), або високим. Пацієнтів з нормальними значеннями було вкрай мало – 4 людини з НС (9,3%) і 5 – з ГІМ (6,7%). Пацієнти з високим вмістом ІЛ-10 на початку захворювання, мабуть, мають якісь попередні чинники, що сприяють активації клітин. У зв'язку з цим обстежені особи були розділені на 2 підгрупи: у підгрупу А увійшли з низьким вмістом ІЛ-10 в мононуклеарах, в підгрупу Б – з нормальним або високим вмістом цього цитокіну (табл. 2).

В обох підгрупах низький вміст ІЛ-10 в мононуклеарах у середньому був практично однаковим, тоді як у підгрупі Б він був істотно вищим у пацієнтів з НС, ніж у хворих з ГІМ (P < 0,05). Цікаво відзначити, що незважаючи на кардинально різні вихідні значення ІЛ-10, до 7-ї доби лікування цей показник був практично однаковим у всіх пацієнтів. Аналіз результатів вмісту досліджуваного

**Таблиця 2. Концентрація інтерлейкіну-10 в супернатантах мононуклеарів хворих з гострим коронарним синдромом в динаміці лікування залежно від його вихідного значення**

Показники	Нестабільна стенокардія		Гострий інфаркт міокарда	
	Низький вміст ІЛ-10 (n = 25)	Високий вміст ІЛ-10 (n = 18)	Низький вміст ІЛ-10 (n = 49)	Високий вміст ІЛ-10 (n = 26)
Вік, роки	56,9 ± 1,5	59,4 ± 1,9	57,7 ± 1,6	54,6 ± 2,1
Стать (жінки), %	24	27,8	12,2	11,5
Маса, кг	80,6 ± 1,8	84,6 ± 2,3	84,5 ± 3,8	79,9 ± 3,3
ІЛ-10, пг/мл в мононуклеарах				
1-ша доба	16,6 ± 4,1	545,9 ± 67,9	19,6 ± 3,6	398,0 ± 43,8
7-ма доба	200,7 ± 45,3*	244,7 ± 79,2*	191,8 ± 37,6*	210,0 ± 60,0*
ІЛ-10, пг/мл в нейтрофілах,				
1-ша доба	14,0 ± 5,0	16,0 ± 6,0	13,8 ± 4,2	6,9 ± 2,1
7-ма доба	15,8 ± 9,6	2,7 ± 0,1*	143,8 ± 59,4*	2,3 ± 1,2*

\*P &lt; 0,05 щодо значень на 1-шу добу.

цитокіну в нейтрофілах в розрізі зазначених груп показав, що у пацієнтів з НС в обох підгрупах він з самого початку був однаковим, але в процесі лікування в підгрупі Б достовірно знижувався, а в підгрупі А залишався на попередньому рівні. У хворих на ГІМ у підгрупі А вміст ІЛ-10 спочатку був подібним до значень у хворих на НС, але істотно підвищувався в динаміці лікування. У підгрупі Б він був в 2 рази нижчим, ніж в альтернативній групі. Але, під час лікування цей показник знижувався і як у хворих на НС, так і на ГІМ цієї підгрупи, до 7-ї доби лікування він став однаковим. Нейтрофіли надходять у вогнище ішемії першими відразу при появі патологічного процесу. Romson [6] показав, що протягом доби в ішемізованому міокарді кількість нейтрофілів зростає в 17 разів. Лімфоцити і моноцити інфільтрують місце пошкодження тільки на 3-4-ту добу. Тому логічно, що основна частина пацієнтів при надходженні до стаціонару має низький вміст ІЛ-10 в мононуклеарах, що зростає в динаміці лікування, але високий – у нейтрофілах. Можна припустити, що клітинні популяції як би заміщають один одного, зокрема,

за вмістом ІЛ-10. На експериментальних моделях було показано, що ІЛ-10 з'являється у великій кількості в міокарді під час ішемії і реперфузії. Це пояснюють підвищенням припливом лімфоцитів і моноцитів в зону інфаркту та зумовленою реперфузією, стимуляцією цитокінів. Існує думка, що в такій ситуації основними джерелами ІЛ-10 є Т-лімфоцити. ІЛ-10 покращує ремоделювання серця після ГІМ за рахунок проліферації, міграції фібробластів і продукції ними колагену, що прямо або побічно призводить до стимуляції поляризації протизапальних М2-макрофагів і поліпшенню процесів репарації міокарда [7].

Таким чином, вміст ІЛ-10 в імункомпетентних клітинах у хворих на різні форми ІХС різний. Він спочатку високий у мононуклеарах пацієнтів зі стенокардією (СС і НС), тоді як при ГІМ знаходиться в рамках референтних значень. Вміст ІЛ-10 в нейтрофілах також істотно вищий у хворих з СС і помірно підвищений з НС і ГІМ. Однак при перерахунку показників на абсолютну кількість клітин у периферичній крові було отримано однаковий вміст цього цитокіну як в мононуклеарах, так і в нейтрофілах у

всіх трьох групах. Підвищення кількості лейкоцитів у хворих на НС і ГІМ може бути направлено на кількісну компенсацію якісної недостатності клітин, необхідну для адекватної протизапальної відповіді.

Разом з тим нами виявлено широкий розкид значень вмісту ІЛ-10 в імункомпетентних клітинах периферичної крові при надходженні пацієнтів з НС і ГІМ у стаціонар. Здебільшого вони мали низький його вміст у мононуклеарах, але високий у нейтрофілах. У динаміці лікування в мононуклеарах концентрація ІЛ-10 змінюється залежно від вихідного її значення – низькі концентрації цитокіну підвищуються, високі – знижуються. При цьому до 7-ї доби лікування вміст досліджуваного фактора в цих клітинах став практично однаковим у всіх підгрупах. Відповідно змінюється і вміст ІЛ-10 в нейтрофілах.

Безсумнівний науковий інтерес являють собою клінічні особливості пацієнтів з гострим коронарним синдромом залежно від вихідного вмісту ІЛ-10. Генетичні чинники, вік, стать, інфекції, навколишнє середовище формують індивідуальний пул імункомпетентних клітин. Без правильної регуляції фізіологічні процеси стають патологічними. Більшість дослідників вважають, що саме дисрегуляція імунної системи, зокрема, дисбаланс між про- і протизапальними цитокінами, може мати серйозний вплив на перебіг ІХС [8]. Низький вміст протизапального цитокіну ІЛ-10 на початку захворювання, ймовірно, є патогенетичною ланкою і предиктором розвитку гострих коронарних подій. Нині ІЛ-10 є однією з привабливих потенційних терапевтичних мішеней [9]. Знання про ІЛ-10 як модулятора стабільності атеросклеротичної бляшки, регулятора процесів пошкодження міокарда і його загоєння у хворих з ГІМ можуть відкрити нові можливості для лікування і профілактики атеросклеротичних захворювань у майбутньому.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated*

*with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**Н.А. Рыжкова, Т.И. Гавриленко, Л.В. Якушко, А.Н. Пархоменко, Н.В. Довгань, Е.В. Довгань, А.Н. Ломаковский, Ю.И. Бабчук, С.Н. Бабий**

### **СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 В СУПЕРНАТАНТАХ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

Обследовано 198 пациентов с ишемической болезнью сердца (стабильная и нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда). Содержание интерлейкина-10 (ИЛ-10) в супернатантах иммунокомпетентных клеток определяли при их госпитализации, а у больных с НС и ОИМ также на 7-е сутки лечения. Выявлен широкий разброс показателей при поступлении пациентов с острым коронарным синдромом в стационар. В связи с этим обследованные лица были разделены на 2 подгруппы: А – с низким содержанием ИЛ-10 в мононуклеарах (нестабильная стенокардия – 58,1%, острый инфаркт миокарда – 75,4%), Б – с нормальным или высоким содержанием данного цитокина. В динамике лечения показатели в мононуклеарах меняются в зависимости от исходного значения концентрации ИЛ-10 – низкое содержание повышается, высокое – снижается. При этом к 7-м суткам лечения содержание исследуемого фактора в этих клетках стало практически одинаковым во всех подгруппах. Низкое содержание противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в начале заболевания предположительно является патогенетическим звеном и предиктором развития острых коронарных событий.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; иммунокомпетентные клетки; цитокины; интерлейкин-10.

**N.O. Ryzhkova<sup>1</sup>, T.I. Gavrilenko<sup>1</sup>, L.V. Yakushko<sup>1</sup>, O.M. Parkhomenko<sup>1</sup>, N.V. Dovgan<sup>1</sup>, O.V. Dovgan<sup>1</sup>, O.M. Lomakovsky<sup>1</sup>, Yu.Y. Babchuk<sup>2</sup>, S.M. Babiy<sup>2</sup>**

### **THE CONTENT OF INTERLEUKIN-10 IN THE SUPERNATANTS OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF CORONARY HEART DISEASE**

<sup>1</sup> State Institution National Scientific Center «M.D. Strazhesko Institute of Cardiology National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv;

<sup>2</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv; e-mail: tala.ruzh@gmail.com

198 patients with coronary heart disease (stable and unstable angina- UA, acute myocardial infarction-AMI) were examined. The content of interleukin-10 (IL-10) in the supernatants of immunocompetent cells was determined at hospitalization. In patients with unstable angina and myocardial infarction it was also measured on the 7th day of the treatment. A wide range of the indicators was revealed when patients were admitted to hospital. In this regard, the subjects were divided into 2 subgroups: A - with a low content of IL-10 in mononuclear cells (UA - 58.1, AMI - 75.4%), B - with a normal or high content of this cytokine in these cells. In the dynamics of treatment, the indicators in mononuclear cells change depending on the initial value of the concentration of IL-10: its low content increases, high - decreases. On the 7th day of treatment, the content of the studied factor in these cells became almost the same in all subgroups. A low level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 at the beginning of the disease is probably a pathogenetic link and a predictor of acute coronary events. Key words: coronary heart disease; immunocompetent cells; cytokines; interleukin-10.

## REFERENCES

1. Potteaux S, Esposito B, van Oostrom O, Brun V, Ardouin P, Groux H, Tedgui A, Mallat Z. Leukocyte-derived interleukin-10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):474-8.
2. Han X, Kitamoto S, Lian Q, Boisvert WA. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J Biol Chem.* 2009;284(47):32950-8.
3. Zimmerman MA, Reznikov LL, Raeburn CD, Selzman CH. Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury. *J Surg Res.* 2004;121:206-13.
4. Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, Spanaus K, Yonekawa K, Wischnowsky MB, Corti R, Kucher N, Roffi M, Eberli F, Amann-Vesti B, Gay S, Eckardstein A, Lüscher T, Maier W. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2010;31:1457-69.
5. Cavusoglu E, Marmur J, Hojjati M, Chopra V, Butala M, Subnani R, Huda MS, Yanamadala S, Ruwende C, Eng C, Pinsky DJ. Plasma interleukin-10 levels and adverse outcomes in acute coronary syndrome. *Am J Med.* 2011;124(8):724-30.
6. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 1983;67:1016-23.
7. Jung M, Ma Y, Iver R, DeLeon-Pennell KY, Yabluchiansky A, Garrett MR, Lindsey ML. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol.* 2017;112(3):33. DOI:10.1007/s00395-017-0622-5.
8. Biswas S, Ghoshal P, Mandal S, Mandal N. Relation of anti- to pro-inflammatory cytokine ratios with acute myocardial infarction. *Korean J Int Med.* 2010;25(1):44-50.
9. Spitz C, Winkels H, Burger C, Weber C, Lutgens E, Hansson GK, Gerdes N. Regulatory T-cells in atherogenesis: critical immune regulatory function and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(5):901-22.
10. Gavrilenko TI, Parkhomenko ON, Ryzhkova NO, Kozhukhov SM, Yakushko LV. Cytokine's profile of mononuclears at patients by myocardial infarction, complicated cardiac insufficiency. *Fisiol Zh.* 2012;6:23-8 [Ukrainian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 28.12.2020*