

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-3-17-21

ВЛИЯНИЕ ЦИТОФЛАВИНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

О. В. Ромащенко¹

Для определения характера влияния цитофлавина в терапевтической концентрации на жизнеспособность лейкоцитов проведено исследование образцов крови 30 пациентов с ишемической болезнью сердца. Лейкоциты из цельной крови выделяли с помощью микропипетки, смешивали с питательной средой RPMI, в опытные лунки добавляли цитофлавин в концентрации, близкой к терапевтической и пробы инкубировали в течение 3 ч в инкубаторе с 5 % содержанием CO₂ при температуре 37 °С, затем пробы окрашивали флуоресцентными красителями (Mito Tracker™ Red CMXRos, Calcein AM, Ethidium bromide) и снова инкубировали при тех же условиях ещё в течение 30 мин. Результаты детектировали методом флуоресцентной микроскопии при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа EclipseTi-U (Nikon, Япония) и анализировали с помощью специализированного программного обеспечения EZ-C1 Free Viewer Ver 3.90. Оценивали интенсивность флуоресценции митохондрий и вычисляли индекс жизнеспособности лейкоцитов по разработанной методике. После введения цитофлавина в пробу с лейкоцитарной взвесью наблюдалось два варианта изменения жизнеспособности клеток: у большинства (80 %) больных отмечено увеличение жизнеспособности лейкоцитов, в среднем, на 60 % ($p < 0,001$) и у 20 % — тенденция к уменьшению данного показателя, в среднем, на 47 % ($p < 0,1$). Величина флуоресценции митохондрий изменялась в обоих случаях в сторону увеличения, но без достижения достоверности различий. Достоверной корреляции между показателями жизнеспособности клеток и интенсивностью флуоресценции митохондрий обнаружено не было (коэффициент корреляции составил 0,28, $p > 0,05$). Цитофлавин у 80 % пациентов с ишемической болезнью сердца способен повышать жизнеспособность клеток (лейкоцитов крови), в среднем, на 60 % и таким образом проявлять цитопротекторный эффект.

Ключевые слова: лейкоциты; жизнеспособность; ишемическая болезнь сердца; пациенты; флуоресцентная микроскопия; цитофлавин; исследование *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Цитофлавин — комплексный препарат метаболического ряда, состоящий из янтарной кислоты, инозина, рибофлавина и никотинамида [11]. Данный препарат способен активировать аэробный гликолиз, т.е. кислород-зависимый процесс энергообразования [3, 11].

Традиционно цитофлавин используется в качестве цитопротекторного лекарственного средства (ЛС) при ишемии головного мозга [1, 3, 11]. При этом, в инструкции к данному ЛС в разделе “Фармакодинамика” сказано, что цитофлавин способен улучшать коронарное кровообращение [11]. С другой стороны, известно, что при ишемии миокарда приток кислорода к кардиомиоцитам ограничен [13] и, соответственно, ресурсов

для аэробного гликолиза у клеток сердца остаётся немного. В этой связи, представляет особый интерес изучение влияния цитофлавина на жизнеспособность клеток и энергетическое состояние митохондрий клеток при гипоксии миокарда у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Подобных исследований, судя по обзору отечественной и зарубежной литературы, не проводилось.

Экспериментальной моделью изучения жизнеспособности клеток явились лейкоциты крови больных, поскольку они могут отражать внутреннее состояние организма человека и являются легкодоступным материалом для исследования. Эти иммунокомпетентные клетки рассматриваются как своего рода “зеркало гомеостаза”, по которому можно определить характер процесса, лежащего в основе болезни, его тяжесть, прогноз и эффективность терапии [10]. Более того, W. Jin et al. на основании ряда собственных исследований утверждают, что характер поврежденных митохондрий

¹ ФГАОУ ВПО “Белгородский государственный национальный исследовательский университет”, Россия, 308017, Белгород, ул. Победы, д. 85.

в кардиомиоцитах и лейкоцитах периферической крови идентичен, в лейкоцитах отражаются изменения, происходящие в кардиомиоцитах [14].

Целью настоящего исследования явилось определение характера влияния цитофлавина на жизнеспособность лейкоцитов крови пациентов с ИБС.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено исследование образцов крови 30 больных с 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 с января по июнь 2019 г. В группу исследования вошли 20 женщин и 10 мужчин в возрасте от 49 до 81 года, средний возраст пациентов составил $66,0 \pm 2,0$ лет.

Взятие крови выполняли 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 разрушительного действия рентгеновских лучей на лейкоциты крови человека и способности белых клеток крови к полному обновлению состава на протяжении 21 дня при средней продолжительности жизни лейкоцитов 7–9 дней [12].

Лейкоциты крови (0,5 мл) отбирали вручную микропипеткой в асептических условиях, смешивали с 2 мл питательной среды RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия), затем помещали в лунки 24-луночного планшета по 20 мкл лейкоцитарной суспензии в каждую лунку. Добавляли питательную среду и ЛП в количестве, указанном на схеме эксперимента. Затем пробы инкубировали в течение 3 ч (время, достаточное для взаимодействия лекарства с клетками) в инкубаторе с 5 % содержанием CO_2 при температуре 37°C (условия внутренней среды человека).

Через 3 ч инкубации из каждой лунки отбирали 500 мкл надосадочной жидкости и в оставшиеся 500 мкл вносили флуоресцентные красители в конечной концентрации 1 нМ/мкл для Mito Tracker™ Red CMXRos (Invitrogen, США), который позволяет оценивать митохондриальный мембранный потенциал и Calcein AM (Invitrogen, США), который окрашивает только жизнеспособные клетки и в конечной концентрации 2 нМ/мкл для этидия бромид (Sigma-Aldrich, США), который окрашивает только погибшие клетки [2]. Пробы снова помещали в термостат при тех же условиях ещё на 30 мин (время, достаточное для окрашивания клеток). При разработке схемы эксперимента руководствовались данными Е. В. Митрошиной и соавт. [4].

Для создания концентрации цитофлавина в лунке, близкой к той, в которой препарат существует в организме после внутривенного капельного введения в объеме 10 мл, растворенном в 200 мл физиологическо-

го раствора, брали 1 мл ампульного раствора цитофлавина, добавляли 1,59 мл воды для инъекций, смешивали и полученный раствор вносили по 5 мкл в лунку.

Результаты оценивали методом флуоресцентной микроскопии при помощи инвертированного микроскопа EclipseTi-U (Nikon, Япония). Обработку полученных данных проводили с помощью специализированного программного обеспечения EZ-C1 Free Viewer Ver 3.90 (Nikon), определяли интенсивность флуоресценции в 100 клетках в 10 полях зрения для каждой лунки, выражая её в условных единицах.

Проводили подсчёт количества живых и мёртвых клеток, рассчитывали индекс жизнеспособности (ИЖ) клеток по формуле, %:

$$\text{ИЖ} = (Z_{\text{живых клеток}} - Z_{\text{погибших клеток}}) / (Z_{\text{погибших клеток}}) \cdot 100,$$

где $Z_{\text{живых клеток}}$ — количество живых клеток в 10 полях зрения; $Z_{\text{погибших клеток}}$ — количество погибших клеток в 10 полях зрения.

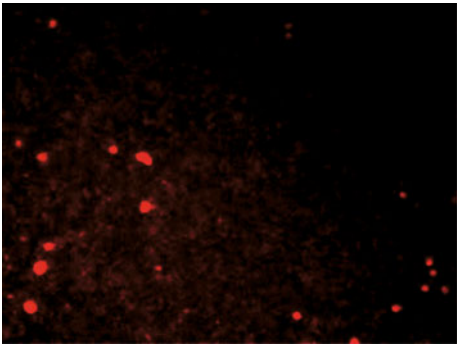
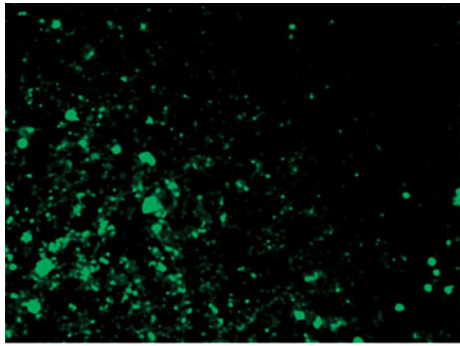
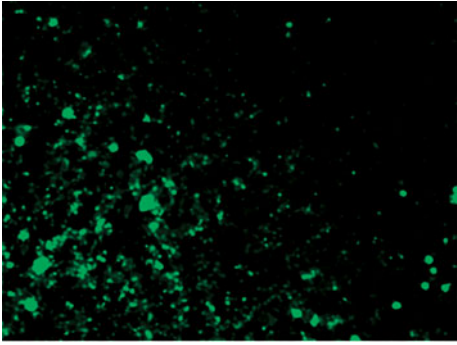
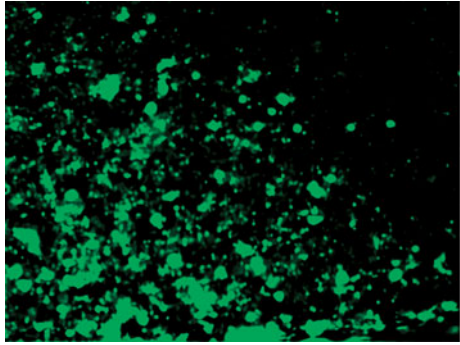
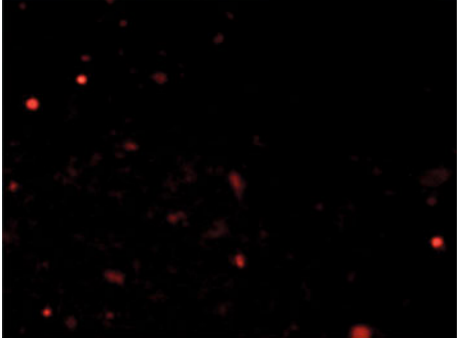
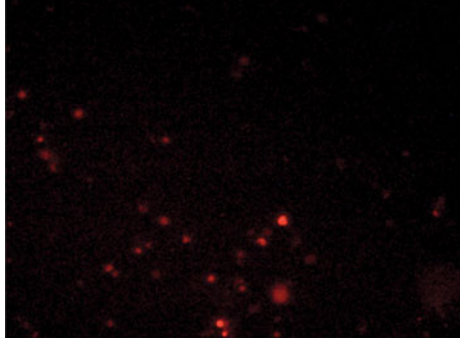
По характеру изменения ИЖ судили о наличии цитопротекторных свойств у цитофлавина по разработанному нами способу [7]: определяли ИЖ в лунках с оценкой динамики данного показателя после введения ЛС; в случае, если при добавлении в пробу ЛС ИЖ увеличивается, то это свидетельствовало о наличии цитопротекторного свойства у изучаемого препарата; если ИЖ снижается, то это — показатель отсутствия цитопротекторных свойств у ЛС.

Всего было проанализировано 12000 клеток. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью теста Колмогорова – Смирнова. Для показателей, имеющих распределение близкое к нормальному, в дальнейшем осуществляли расчет среднего арифметического значения, стандартного (среднеквадратического) отклонения и ошибки среднего, как отношения стандартного отклонения к квадратному корню из количества анализируемых значений. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Исследование проводили на базе лаборатории клеточных технологий НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных лунках (без внесения ЛП) при анализе флуоресценции митохондрий лейкоцитов крови, окрашенных Mito Tracker Red, обнаружены чётко светящиеся клетки, круглые и оформленные, что свидетельствует о нормально функционирующих митохондриях (рис. 1, а). Средняя величина флуоресценции по группе составила $120,20 \pm 4,18$ отн. ед., что является интегральным показателем величины флуоресценции (ВФ), определённой для каждой клетки отдельно в 100 клетках каждого пациента и усреднено для всех больных в исходном состоянии. Одновременное окрашивание проб Calcein AM показало, что все светящиеся

	Без цитофлавина (Рис. 1)	С цитофлавином (Рис. 2)
А. Свечение митохондрий лейкоцитов крови (краситель — MitoTrackerRed). Флуоресцентная микроскопия, ув. $\times 200$		
Б. Свечение мембранных структур живых белых клеток крови (краситель — Calcein AM). Флуоресцентная микроскопия, ув. $\times 200$		
С. Свечение погибших лейкоцитов (краситель — этидий бромид). Флуоресцентная микроскопия, ув. $\times 200$		

клетки с функционирующими митохондриями — живые (рис. 1, б). Количество погибших клеток по отношению к общему количеству анализируемых клеток составило 37 % (рис. 1, в). ИЖ лейкоцитов у пациентов с ИБС, в среднем по группе (без внесения цитофлавина), составил 41 %.

При флуоресцентной микроскопии лейкоцитов крови пациентов с ИБС в лунках, в которые добавляли цитофлавин в терапевтической концентрации и краситель Mito Tracker Red, обнаружены чётко светящиеся клетки, круглые и оформленные, что свидетельствует о нормально функционирующих митохондриях (рис. 2, а). ВФ митохондрий в среднем по группе составила $124,58 \pm 3,61$ отн. ед., что выше в сравнении с контролем ($120,20 \pm 4,18$ отн. ед.), однако без достижения уровня достоверности различий ($p > 0,05$). Окраска тех же проб Calcein AM показала, что все светящиеся клетки с функционирующими митохондриями — живые (рис. 2, б). Количество погибших клеток по отношению к общему количеству анализируемых кле-

ток составило 39 % (рис. 2, в). ИЖ лейкоцитов у пациентов с ИБС, в среднем по группе, после внесения цитофлавина существенно не изменился и составил 40 %. При более детальном анализе характера влияния цитофлавина на жизнеспособность клеток обнаружили два варианта реагирования лейкоцитов на введение препарата, активирующего аэробный гликолиз: у большинства (80 %) больных отмечено увеличение жизнеспособности лейкоцитов, в среднем, на 60 % ($p < 0,001$) и у 20 % — тенденция к уменьшению данного показателя, в среднем, на 47 % ($p < 0,1$) (рис. 3).

На рис. 3 четко продемонстрировано как характер реагирования клеток зависел от исходного их состояния: при исходно положительном ИЖ (когда количество живых клеток преобладало над количеством погибших) введение цитофлавина способствовало улучшению данного показателя, тогда как при исходно отрицательном ИЖ (когда количество погибших клеток преобладало над количеством живых) введение ци-

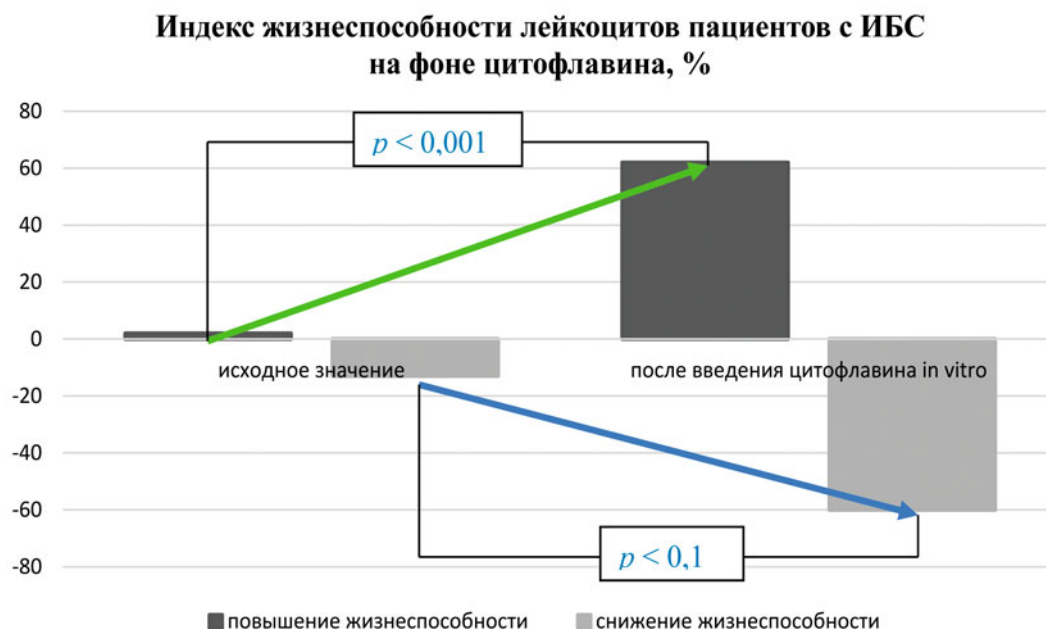


Рис. 3. Влияние цитофлавина на ИЖ лейкоцитов периферической крови пациентов с ИБС (терапевтическая концентрация, 3 ч инкубации, *in vitro*).

тофлавина ассоциировалось с ухудшением данного показателя.

При проведении качественного анализа ИЖ и ВФ митохондрий по каждому пациенту выяснилось, что ИЖ увеличивался у 24 пациентов (80 %) и уменьшался у 6 пациентов (20 %), в то время как ВФ митохондрий повышалась у 18 пациентов (60 %) и снижалась у 12 (40 %), что свидетельствует об отсутствии тесной корреляции этих показателей. Чёткой зависимости между показателями жизнеспособности клеток и ВФ их митохондрий не было обнаружено (коэффициент корреляции составил 0,28; $p > 0,05$).

По-видимому, повышение жизнеспособности клеток под влиянием ЛС, 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 изучения *in vitro*) проявляется при условии отсутствия патологических генных полиморфизмов цитохрома СYP 2C9, а также эндотелиальной NO-синтазы, ответственных за нормальное состояние эндотелия сосудов как важного фактора обеспечения адекватной доставки кислорода к тканям [8, 9].

При ИБС из-за длительной прогрессирующей гипоксии развивается вторичная митохондриальная дисфункция кардиомиоцитов, требующая фармакологической коррекции [15]. Применение энерготропных ЛС для устранения митохондриальной дисфункции является патогенетически обоснованным, однако не всегда оказывается эффективным [5].

Цитофлавин содержит, наряду с сукцинатом, никотинамид, рибофлавина мононуклеотид и инозин [11].

Входящие в состав препарата компоненты потенцируют антигипоксическое действие сукцината. Так, рибофлавин повышает активность сукцинатдегидрогеназы, инозин увеличивает общее количество пуриновых нуклеотидов, необходимых для ресинтеза аденозинтрифосфата (АТФ) и гуанозинтрифосфата (ГТФ). В настоящее время продемонстрирована эффективность включения цитофлавина в терапию таких состояний, как острое и хроническое нарушение мозгового кровообращения, дисциркуляторная энцефалопатия, перинатальное гипоксически-ишемическое поражение ЦНС, для которых характерна вторичная митохондриальная дисфункция [6]. В этой связи, вполне возможно использование цитофлавина в качестве антигипоксанта и при ИБС для коррекции митохондриальной дисфункции, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения и персонализированного подхода.

Таким образом, показано, что препарат метаболического типа действия цитофлавин способен улучшать жизнеспособность лейкоцитов крови у части пациентов с ИБС при условии сохранения их жизненного ресурса в исходном состоянии. Перспективы настоящего исследования, на наш взгляд, сводятся к определению критериев персонализированного отбора больных с ИБС, для которых целесообразно использование цитофлавина в качестве цитопротектора. Потенциальная возможность использования цитофлавина в комплексном лечении пациентов с ИБС нацеливает на расширение показаний к использованию данного ЛП.

ВЫВОДЫ

1. При введении цитофлавина в концентрации, близкой к терапевтической, в пробу с лейкоцитарной

взвесью, полученной из крови пациентов с ИБС, наблюдалось два варианта изменения жизнеспособности клеток: у большинства (80 %) больных отмечено увеличение жизнеспособности лейкоцитов, в среднем, на 60 % ($p < 0,001$) и у 20 % — тенденция к уменьшению данного показателя, в среднем, на 47 % ($p < 0,1$).

2. Чёткой зависимости между показателями жизнеспособности клеток и величиной флуоресценции их митохондрий не было обнаружено (коэффициент корреляции составил 0,28, $p > 0,05$).

3. По данным эксперимента *in vitro*, цитофлавин способен проявлять цитопротекторную активность у части пациентов с ИБС путём повышения жизнеспособности клеток.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает свою искреннюю благодарность директору НИИ Фармакологии живых систем НИУ “БелГУ” профессору, д.м.н. Покровскому М. В. и руководителю лаборатории клеточных технологий НИИ Фармакологии живых систем доценту, к.б.н. Надеждину С. В. за предоставленную возможность выполнения исследования на базе указанной лаборатории. Автор также выражает свою признательность заведующему отделением кардиологии № 1 доценту, к.м.н. Алфёрову П. К. за оказанное содействие при наборе клинического материала для исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. Р. Камчатнов, Б. А. Абусева, М. А. Евзельман и др., *Доктор. Ру*, **161**(6), 23 – 26 (2019); doi: 10.31550 / 1727-2378-2019-161-6-23-26.
2. П. М. Ларионов, А. Н. Малов, М. М. Мандрик и др., *Ж. прикладн. спектроскопии*, **70**(1), 38 – 42 (2003); doi: 10.1023 / A:1023212206592.

3. Г. А. Ливанов, А. Т. Лоладзе, А. Н. Лодягин и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **80**(6), 30 – 33 (2017); doi: 10.30906 / 0869-2092-2017-80-6-30-33.
4. Е. В. Митрошина, Т. А. Мищенко, М. В. Ведунова, *Определение жизнеспособности клеточных культур. Учебно-методическое пособие*, Нижний Новгород (2015), с. 21.
5. В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. Н. Иванцова, *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*, **19**(1), 41 – 55 (2020); doi
6. С. В. Оковитый, Д. С. Суханов, В. А. Заплутанов и др., *Клин. мед.*, **16**(9), 63 – 68 (2012).
7. М. В. Покровский, О. В. Ромащенко, С. В. Надеждин и др., *Способ определения цитопротекторного свойства у лекарственного препарата. Свидетельство о ноу-хау № 336 от 9.11.2020*, НИУ “БелГУ”, Белгород ().
8. О. В. Ромащенко, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **81**(6), 14 – 19 (2018); doi: 10.30906 / 0869-2092-2018-81-6-14-19.
9. О. В. Ромащенко, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **82**(1), 16 – 21 (2019); doi: 10.30906 / 0869-2092-2019-82-1-16-21.
10. Л. Б. Узенбаева, А. Г. Кижина, В. А. Илюха и др., *Известия РАН. Сер. биол.*, **46**(4), 398 – 406 (2019); doi: 10.1134 / S000232919030135.
11. *Цитофлавин*, Рег. Удостоверение № Р N003135 / 01 – 220319.
12. L. H. Brubaker, L. J. Essig, C. E., *Blood*, **50**, 657 – 662 (1977); PMID: 901939.
13. G. Heusch, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **316**(6), H1439 – H1446 (2019); doi: 10.1152 / ajpheart.00139.2019.
14. W. Jin, G. Deng-Feng, W. Hao, et al., *PLOS ONE Dec 31*, **9**(12), e116239 (2014); doi: 10.1371 / journal.pone.0116239.eCollection2014.
15. R. K. Rai, O. M. Russell, R. N. Lightowers, et al., *British Med. Bul.*, **116**(7), 5 – 18 (2015); PMID: 26590387, doi: 10.1093 / bmb / ldv046.

Поступила 03.03.21

THE INFLUENCE OF CYTOFLAVIN ON THE VIABILITY OF BLOOD LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

O. V. Romashchenko

Belgorod State National Research University, ul. Pobedy 85, Belgorod, 308017 Russia

To determine the character of the effect of Cytoflavin at a therapeutic concentration on the viability of leukocytes, a study of blood samples from 30 patients with ischemic heart disease (IHD) was carried out. Leukocytes from whole blood were isolated using a micropipette, mixed with a nutrient medium RPMI, Cytoflavin at a therapeutic concentration was added to experimental wells, and the samples were incubated for 3 h in an incubator with 5% CO₂ at 37°C. Then the samples were stained with fluorescent dyes (Mito Tracker™ Red CMXRos, Calcein AM, Ethidium bromide) and incubated again under the same conditions for another 30 min. The results were detected by fluorescence microscopy using an Eclipse Ti-U inverted fluorescence microscope (Nikon, Japan) and analyzed using the dedicated software EZ-C1 Free Viewer Ver. 3.90. Determined the intensity of mitochondria fluorescence and calculated the index of leukocytes viability according to our method. According to the results of the study, when Cytoflavin was injected into a sample with a leukocyte suspension, two variants of changes in cell viability were observed: in most (80 %) patients, an increase in the viability of leukocytes was noted, on average, by 60% ($p < 0.001$), and in 20%, a tendency to decrease this indicator, on average, by 47% ($p < 0.1$). The value of mitochondrial fluorescence changed in both cases upward, but without achieving the significance of differences. No significant correlation was found between the indicators of cell viability and the intensity of mitochondrial fluorescence (the correlation coefficient was 0.28, $p > 0.05$). Cytoflavin in 80% of patients with ischemic heart disease is able to increase the viability of cells (blood leukocytes), on average, by 60% and thus exhibits a cytoprotective effect.

Keywords: leukocytes; viability; ischemic heart disease; patients; microscopy; cytoflavin; *in vitro* study.