

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ КОРОНАРНОМ И МУЛЬТИФОКАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Айталиа Семеновна ГОЛЬДЕРОВА¹, Ирина Николаевна НИКОЛАЕВА¹,
Анна Николаевна РОМАНОВА¹, Владимир Александрович КОЗЛОВ²

¹Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН
677010, г. Якутск, Сергеляхское ш., 4

²НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630047, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

В данном исследовании приведен сравнительный анализ экспрессии антигенных маркеров лимфоцитов периферической крови у больных с верифицированным мультифокальным ($n = 44$) и коронарным атеросклерозом ($n = 49$), выявивший существенные различия в зависимости от локализации и распространенности атеросклеротического процесса. При коронарном атеросклерозе значимо повышается экспрессия CD11b+, которая сочетается с тенденцией к повышению содержания NK-клеток (CD16+) и к снижению количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). При мультифокальном атеросклерозе у больных наблюдается значимое увеличение относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), экспрессии рецептора трансферрина CD71+, рецептора апоптоза CD95+, адгезивного рецептора CD54+ а также снижение экспрессии лимфоцитами L-селектина CD62L+.

Ключевые слова: атеросклероз, лимфоциты, молекулы адгезии.

Атеросклероз — системное заболевание артериальной системы — представляет собой сложный многоэтапный патологический процесс, поражающий внутреннюю оболочку артерий крупного и среднего калибра [1]. В настоящее время атеросклеротические поражения сосудов рассматриваются как воспалительный и репаративный ответы на хроническое и эпизодическое повреждение интимы артерий, в котором принимают участие лимфоциты, моноциты/макрофаги, цитокины, молекулы межклеточной адгезии, белки острой фазы, компоненты комплемента, активные формы кислорода, оксид азота и другие факторы, формирующие пролиферативный пул в месте повреждения [2–5]. Участие Т-лимфоцитов в атерогенезе обусловлено их ролью в антигенном распознавании, клональной экспансии, инициации клеточно-опосредованного воспалительного ответа и подтверждено результатами клинко-иммунологических исследований, демонстрирующих сопряженность манифестации клинических симптомов атеросклероза и процессов Т-клеточной активации [4]. Хроническая Т-клеточная активация, сопровождающаяся увеличением количества лимфоцитов, которые экспрессируют активационные антигены, наблюдается не только в зоне повреждения, но и в периферической крови и встречается у пациен-

тов с различными формами атеросклероза. Полагают, что активация Т-лимфоцитов и, скорее всего, CD4+-Т-лимфоцитов происходит в Т-зоне лимфатических узлов, регионарных к поврежденным участкам сосудов, откуда активированные Т-клетки мигрируют в соответствующие участки сосудистой стенки [3].

Оценка иммунного статуса больных атеросклерозом позволила установить у них существенный дисбаланс иммунологических показателей, характеризующийся высокой активностью гуморального иммунитета, сопряженного с относительным дефицитом Т-клеточного звена иммунной системы [6]. У больных ишемической болезнью сердца с ожирением и дислипидемией выявлены высокие уровни цитотоксических лимфоцитов CD8+ и Т-клеток. Обнаружены статистически значимые корреляционные связи между экспрессией маркеров CD95+ и индексом массы тела, показателями липидного обмена на атерогенной направленности и активностью креатинфосфокиназы [7]. Учитывая, что данные о функциональном состоянии лимфоцитов при атеросклерозе сосудов немногочисленны и противоречивы, значительный интерес представляет сравнение иммунологических показателей в зависимости от локализации и распространенности атеросклеротического процесса.

Гольдерова А.С. — к.м.н., гл.н.с. отдела изучения механизмов адаптации; e-mail: hoto68@mail.ru

Николаева И.Н. — ст.н.с. лаборатории иммунопатологии; e-mail: irinikolaeva@mail.ru

Романова А.Н. — к.м.н., зав. лабораторией клинко-популяционных исследований; e-mail: ranik@mail.ru

Козлов В.А. — академик РАМН, директор; e-mail: v_kozlov@online.nsk.su

Материал и методы

Нами было обследовано 93 больных (74 мужчины и 19 женщин), поступивших в стационарные отделения кардиологии и сосудистой хирургии Республиканской больницы № 1 Национального центра медицины г. Якутска. Возраст больных составил от 24 до 71 года (средний возраст $53,9 \pm 8,6$ года). В контрольную группу вошли 9 здоровых мужчин и 6 женщин, сопоставимых по возрасту и не имеющих в анамнезе ишемической болезни сердца и сосудистой патологии. Критериями исключения из исследования являлись острые воспалительные, аутоиммунные и опухолевые заболевания. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.).

По результатам ангиографических исследований (селективная коронарография, каротидная, тазово-дистальная ангиография) больные были разделены по локализации и распространенности атеросклеротического процесса на 2 группы: одну составили 44 больных кардиологического отделения (36 мужчин и 8 женщин со средним возрастом $52,6 \pm 7,7$ года) с различной степенью выраженности коронаросклероза, вторую — 38 мужчин и 11 женщин (средний возраст $55,1 \pm 9,2$ года) с мультифокальным атеросклерозом, т.е. с атеросклеротическим поражением таких сосудистых бассейнов, как экстракраниальные артерии, артерии нижних конечностей, чревного ствола, брыжеечных и почечных артерий. Забор крови производился в течение первых суток после поступления больных на стационарное обследование и лечение.

Для иммунологических исследований использовали лимфоциты, выделенные из периферической крови, которую забирали в равных условиях: утром натощак в объеме 5–7 мл. Выделение лимфоцитов из венозной крови проводили в градиенте плотности фиколла-верографина. Иммунофенотипирование лимфоцитов выполняли методом проточной цитометрии (цитофлуориметр FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител с тройной меткой (CD3FITC + CD4RPE + CD45RPE-Cy5, CD3FITC + CD19-RPE + CD45RPE-Cy5, CD3FITC + CD8RPE + CD45RPE-Cy5, CD16FITC + CD19RPE + CD3RPE-Cy5) и с одной меткой (CD25-RPE, CD11b-RPE, CD71-FITC (Dako, Дания), CD54-RPE, CD95-RPE (Becton Dickinson), CD62L-FITC (Сорбент, Санкт-Петербург)). Проанализированы относительные содержания лимфоцитов, экспрессирующих следующие маркеры: CD3+ — Т-лимфоциты, CD4+ — Т-хелперы, CD8+ — цитотоксические Т-лимфоциты, CD16+ — NK-клетки, CD19+ —

В-лимфоциты, CD11b+ — α^M -цепь интегрина, CD25+ — низкоафинная α -цепь рецептора к ИЛ-2, CD54+ — адгезивный рецептор ICAM-1, CD62L+ — адгезивная молекула L-селектин, CD71+ — рецептор к трансферрину, CD95+ — проапоптотический маркер.

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ SPSS 11.5 for Windows. Данные представлены в виде: среднее арифметическое (M) \pm ошибка среднего арифметического (m). Проверку нормальности распределения количественных признаков проводили с помощью W-критерия Шапиро — Уилка и критерия Колмогорова — Смирнова. Различия средних значений показателей в двух независимых группах оценивали с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни и параметрического t-критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину 0,05.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных нами данных показывает, что средние значения относительного содержания Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+) и В-лимфоцитов (CD19+) в исследуемых группах находятся в диапазоне физиологических норм, а уровень NK-клеток (CD16+) у больных с коронаросклерозом имеет тенденцию к повышению. Сравнительный анализ данных между исследуемыми и контрольной группами не выявил статистически значимых различий по относительному содержанию CD3+, CD4+, CD16+ и CD19+ (табл.).

Статистически значимое различие между исследуемыми группами выявлено по относительному содержанию цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). Так, у больных с мультифокальным атеросклерозом он оказался выше, чем у лиц контрольной группы (в 1,31 раза, $p \leq 0,01$) и больных коронаросклерозом (в 1,54 раза, $p \leq 0,001$). При этом следует отметить, что у больных с коронаросклерозом уровень CD8+-Т-клеток имеет тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой. Известно, что CD8+ могут проявлять свою цитотоксическую активность в отношении антигенпрезентирующей клетки, экспрессирующей чужеродные пептиды в комплексе с молекулами МНСI, а также несут функции уничтожения собственных клеток, тем самым отрицательно влияя на течение заболевания посредством разрушения клеток-мишеней или индукции хронического воспалительного состояния. Выявленное нами повышение содержания в крови цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) свидетельствует об активации эффекторного звена клеточного иммунитета у больных с мультифокальным атеросклерозом и может быть ассоциировано с распространенностью и со степенью тяжести атеросклеротического процесса. Иммунорегуляторный

Таблица

Фенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови, $M \pm m$ (%)

Показатель	Контрольная группа (n = 13)	Пациенты с коронарным атеросклерозом (n = 44)	Пациенты с мультифокальным атеросклерозом (n = 49)
Т-лимфоциты (CD3+)	72,15 ± 1,41	71,11 ± 1,59	74,04 ± 1,73
Т-хелперы (CD4+)	41,84 ± 3,8	40,9 ± 1,84	41,97 ± 1,62
Цитотоксические лимфоциты (CD8+)	26,76 ± 2,13	22,8 ± 1,49	34,85 ± 1,41*,#
ИРИ (CD4+/CD8+)	1,84 ± 0,34	2,27 ± 0,22	1,34 ± 0,91#
НК-клетки (CD16+)	13,69 ± 1,45	18,9 ± 1,52	16,61 ± 1,50
В-лимфоциты (CD19+)	7,15 ± 0,75	8,43 ± 1,00	8,66 ± 1,41
Рецептор к ИЛ-2 (CD25+)	13,4 ± 1,54	16,76 ± 1,67	18,6 ± 1,63
α^M -цепь интегрина (CD11b+)	23,85 ± 2,11	40,2 ± 2,65*	26,21 ± 2,14#
Рецептор ICAM-1 (CD54+)	27,38 ± 3,49	29,85 ± 2,86	45,95 ± 2,96*,#
L-селектин (CD62L+)	66,75 ± 5,11	50,32 ± 2,67*	40,58 ± 2,62*,#
Рецептор к трансферрину (CD71+)	2,33 ± 0,55	5,14 ± 0,56*	7,29 ± 0,91*
Рецептор апоптоза (CD95+)	37,3 ± 4,3	41,6 ± 3,52	55,35 ± 3,39*,#

Примечание: * – достоверное ($p \leq 0,01$) отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы, # – группы 2.

индекс ИРИ (CD4+/CD8+) у больных с коронаросклерозом имеет тенденцию к повышению по сравнению с контрольной группой, а у больных с мультифокальным атеросклерозом это соотношение оказалось статистически значимо сниженным ($p \leq 0,001$) по сравнению с группой больных коронаросклерозом.

Миграция лимфоцитов, их активация и эффекторные функции зависят от молекул клеточной адгезии, которые связаны с плазматической мембраной белков и обеспечивают высокоселективное межклеточное взаимодействие. Во многих случаях отдельная молекула межклеточной адгезии способна взаимодействовать не с одним, а с несколькими лигандами, для чего служат разные участки связывания [8]. Экспрессия адгезивных молекул на эндотелии и лейкоцитах является начальным этапом их рекрутирования в очаг воспаления, что сопровождается возникновением широкого спектра реакций, имеющих в своей основе защитный характер, но приводящих при чрезмерной длительности или интенсивности к дополнительному развитию дистрофических и некротических изменений. Такой процесс характерен для локального воспаления в стенке сосудов, лежащего в основе развития атеросклероза.

В соответствии с классификацией адгезивные молекулы подразделяются на селектины, интегрины, суперсемейство иммуноглобулинов и кадгеринины [9].

Нами оценены уровни экспрессии следующих адгезивных молекул: CD54+ (ICAM-1, молекула межклеточной адгезии 1 типа, принадлежащая к суперсемейству иммуноглобулинов), CD11b+ (α^M -цепь интегрина CR3) и CD62L+ (L-селектин).

Сравнительный анализ адгезивных молекул в исследуемых группах показал статистически значимое превышение экспрессии CD54-позитивных лимфоцитов у больных с мультифокальным атеросклерозом по сравнению с контрольной группой в 1,68 раза, $p \leq 0,001$) и с больными коронарным атеросклерозом (в 1,54 раза, $p \leq 0,001$). Следует отметить, что экспрессия этих молекул на эндотелии сосудов имеет постоянный характер, но значительно усиливается при его стимуляции провоспалительными цитокинами и модифицированными липопротеинами. На покое лимфоцитах периферической крови CD54 экспрессирован слабо, но экспрессия возрастает при активации Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и моноцитов. Растворимые молекулы CD54+ действуют как инги-

биторы иммунных реакций между НК-клетками, цитотоксическими Т-лимфоцитами.

CD11b+ (α^M -цепь) в комбинации с β -цепью (CD18+) образует специфичный для лейкоцитов интегрин, обозначаемый как Mac-1 (macrophage receptor-1) или рецептор инактивированного комплемента CR3, он экспрессируется на миелоидных клетках и естественных киллерах [10]. При анализе полученных данных оказалось, что содержание этого адгезивного маркера, в отличие от других, значительно повышено у лиц с коронарным атеросклерозом по сравнению с контрольной группой (в 1,68 раза, $p \leq 0,001$) и с больными мультифокальным атеросклерозом (в 1,53 раза, $p \leq 0,001$). Учитывая то, что у больных с коронаросклерозом, в отличие от пациентов с мультифокальным атеросклерозом, также наблюдается тенденция к повышению НК-клеток (CD16+), мы провели корреляционный анализ, который указывает на прямую взаимосвязь между количеством клеток CD11b+ и CD16+ ($r = 0,383$, $p \leq 0,001$). Известно, что CD16+ способны реализовывать прямую и антителозависимую цитотоксичность, обеспечивая первый уровень защиты против опухолей и внутриклеточных инфекций до включения специфических иммунных механизмов и вызывая лизис определенных типов клеток-мишеней без предварительной их сенсibilизации.

CD62L+ (L-селектин) обеспечивает прикрепление лимфоцита к эндотелиальной клетке. При активации лимфоцитов часто возникает «смывание» L-селектина, что сопровождается активацией $\beta 2$ -интегринового комплекса (CD11/CD18) лимфоцитов и моноцитов [11]. В результате гидролиза пептидной связи (Lys321-Ser322) в примембранной области селектина L (74 кДа) и образования его растворимой формы (68 кДа) нарушается контакт между лимфоцитом и эндоте-

лиальной клеткой. Потеря адгезионных молекул с поверхности клеток может быть одной из форм негативной регуляции воспаления [12]. В нашем исследовании уровень CD62L+ у больных мультифокальным атеросклерозом оказался значимо сниженным ($p \leq 0,001$) по сравнению с контрольной группой (в 1,63 раза), с группой больных коронарным атеросклерозом (в 1,32 раза). Полученные результаты свидетельствуют о наиболее выраженных нарушениях регуляции опосредованной L-селектином адгезии у больных мультифокальным атеросклерозом.

CD71+ (рецептор к трансферрину) является ранним активационным маркером лимфоцитов, обнаруживается на большинстве делящихся клеток [10]. Содержание лимфоцитов с высокой пролиферативной активностью, экспрессирующих CD71+, при мультифокальном атеросклерозе оказалось значимо выше, чем в контроле (в 3,11 раза, $p \leq 0,001$) и при коронарном атеросклерозе (в 1,35 раза, $p \leq 0,01$). Увеличение числа CD71-позитивных лимфоцитов с высокой пролиферативной активностью отражает процессы активации иммунной системы, появление ранних предшественников (лимфобластов), нарушение нормального процесса созревания иммуноцитов.

CD95+ — мембранный белок типа I суперсемейства фактора некроза опухолей — содержит домен смерти, широко распространен на клетках разных тканей. После активации на Т-лимфоцитах повышается экспрессия CD95+. Помимо функции индуктора клеточной смерти, CD95+ может участвовать в запуске пролиферативных сигналов в Т-лимфоцитах [10]. Нами обнаружено, что у больных с мультифокальным атеросклерозом статистически значимо увеличено содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы индукции апоптоза CD95+, по сравнению с контрольной

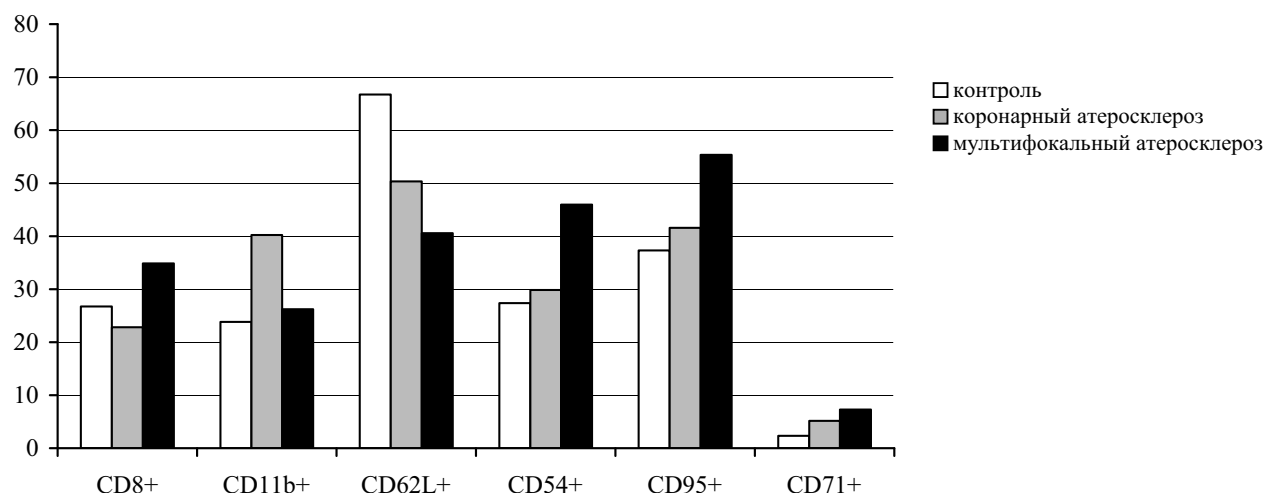


Рис. Значимые различия экспрессии лимфоцитов при коронарном и мультифокальном атеросклерозе у сравниваемых групп (%)

группой (в 1,48 раза, $p \leq 0,01$) и с больными коронарным атеросклерозом (в 1,33 раза, $p \leq 0,01$). Известно, что с участием CD95+ удаляются Т-клетки, которые активируются неспецифически и неполноценно. Выявленное нами увеличение экспрессии CD95+, свидетельствующее об усилении апоптоза лимфоцитов, возможно, связано с процессами активации иммунной системы и нарушением процессов нормального созревания иммуноцитов. Значимое повышение пролиферативной активности у лиц с мультифокальным атеросклерозом по сравнению с пациентами с коронарным атеросклерозом подтверждается выявленным увеличением экспрессии маркера ранней активации Т-лимфоцитов CD71+.

Заключение

Проведенная нами фенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови больных с верифицированным атеросклеротическим поражением сосудов выявила существенные различия в зависимости от локализации и распространенности атеросклеротического процесса (рис.). Так, у больных с атеросклерозом коронарных сосудов выявлено значимое повышение экспрессии CD11b+ (α^M -цепи интегрина), которое сочетается с тенденцией к увеличению содержания NK-клеток (CD16+) и к снижению количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). При мультифокальном атеросклерозе у больных наблюдается значимое повышение относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) и экспрессии рецепторов к трансферрину (CD71+), апоптоза CD95+, ICAM-1 (CD54+), а также значимое снижение экспрессии L-селектина (CD62L+). Полученные результаты требуют дальнейшего углубленного изучения и анализа.

Список литературы

1. Акберов Р.Ф., Шарафаев А.З., Михайлов М.К. и др. Прогрессирующий мультифокальный атеросклероз: этиология, клинко-лучевая диагностика, современные аспекты лечения. Казань: Идеал-Пресс, 2008. 214 с.
2. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 608 с.
3. Ярилин А.А. Immunology bases. М.: Medicine, 1999. 608 p.
4. Пигаревский П.В. Морфометрическое исследование клеток иммунорегуляторного и эффекторного звеньев иммунитета в аорте и парааортальных лимфатических узлах при атерогенезе у человека // Цитокины и воспаление. 2002. (4). 21–26.

5. Pigarevsky P.V. Morphometric research of cells of immunoregulatory and effector components of immune system in aorta and paraaortic lymph nodes at human atherogenesis // Tsitokiny i vospalenie. 2002. (4). 21 – 26.
6. Czyz A., Kolacz E., Angerer D. et al. Expression of activation antigens on lymphocyte surface and circulating platelet-leukocyte aggregates in ischaemic heart disease // Kardiol. Pol. 2005. 62. 189–200.
7. Wu R. Induction of human cytotoxic T-lymphocytes by oxidized low density lipoproteins // Scand. J. Immunol. 1996. 43. 381–384.
8. Дзяк Г.В., Коваль Е.А. Клинико-иммунологические критерии оценки прогноза и лечения атеросклероза и ревматизма // Журн. АМН України. 1998. (1). 78–87.
9. Дзяк Г.В., Коваль Е.А. The clinical and immunological criteria of an assessment of the forecast and treatment of atherosclerosis and rheumatism // Zhurn. AMN Ukraini. 1998. (1). 78–87.
10. Миролюбова О.А., Добродеева Л.К., Сенькова Л.В., Зыков Н.И. Особенности иммунного статуса у больных ишемической болезнью сердца с ожирением и атерогенной дислипидемией // Проблемы эндокринологии. 2000. (4). 14–16.
11. Mirolyubova O.A., Dobrodeeva L.K., Senkova L.V., Zykov N.I. The immune status features at patients with ischemic heart disease and adiposity and atherogenic dyslipidemia // Problemy endokrinologii. 2000. (4). 14–16.
12. Jourdan J.E., Zhao Z.-Q., Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia – reperfusion injury // Cardiovasc. Res. 1999. 43. (4). 860–878.
13. Талаева Т.В. Механизмы взаимодействия клеток крови и сосудистой стенки в реализации воспалительного и иммунного ответов // Украинський ревматол. журн. 2001. (3–4). 45–52.
14. Talaeva T.V. The mechanisms of interaction between blood cells and vascular wall in realization of inflammatory and immune response // Ukrainiyskij revmatol. zhurn. 2001. (3–4). 45–52.
15. Ковальчук Л.В. Антигенные маркеры клеток иммунной системы человека CD (Cluster differentiation) система: Учебно-методическое пособие для студентов, ординаторов, аспирантов медицинских ВУЗов. М., 2003. 76 с.
16. Kovalchuk L.V. The antigenic markers of cells human immune system of CD (Cluster differentiation) system: Manual for students, interns, post-graduate students of medical high schools. М., 2003. 76 p.
17. Lefler A.M. Selectins: vital vasculotropic vectors involved in vascular remodeling // Circulation. 1997. 96. 3258–3260.
18. Bazil V. Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane molecules // Immunol. Today. 1995. 16. 135–140.

THE PHENOTYPIC CHARACTERISTIC OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AT THE CORONARY AND MULTIFOCAL ATHEROSCLEROSIS

Aitalina Semenovna GOL'DEROVA¹, Irina Nikolaevna NIKOLAEVA¹, Anna Nikolaevna ROMANOVA¹, Vladimir Aleksandrovich KOZLOV²

¹*Yakutsk Research Centre for Integrated Medical Problems SB RAMS
677010, Yakutsk, Sergelyakhskoe h., 4*

²*Institute of Clinical Immunology SB RAMS
630047, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14*

In the research the comparative analysis of an expression of antigenic markers of peripheral blood lymphocytes at patients with verified multifocal (n = 44) and a coronary atherosclerosis (n = 49) is resulted, which revealed essential distinctions depending on localization and prevalence of atherosclerotic process. At the coronary atherosclerosis the expression CD11b+ combined with the tendency to increase percentage of NK cells (CD16+) and to decrease cytotoxic T-lymphocytes (CD8+) significantly raises. The significant increase in abundance ratio of cytotoxic T-lymphocytes (CD8+), expression of transferrin (CD71+) receptor, receptor of apoptosis (CD95+), adhesive receptor (CD54+) as well as the decrease in an expression by lymphocytes L-selectin CD62L+ has been revealed at patients with multifocal atherosclerosis.

Key words: atherosclerosis, lymphocytes, adhesion molecules.

Gol'derova A.S. – candidate of medical sciences, chief researcher of the department for adaptation mechanisms investigation; e-mail: hoto68@mail.ru

Nikolaeva I.N. – senior researcher of the laboratory of immunology; e-mail: irinikolaeva@mail.ru

Romanova A.N. – candidate of the medical sciences, head of the laboratory of clinical and population researches; e-mail: ranik@mail.ru

Kozlov V.A. – academician of RAMS, director; e-mail: v_kozlov@online.nsk.su