

ворожденных: автореф. дис... д-ра мед. наук / Т.В. Красовская. – М., 1991.

Krasovskaya T.V. Optimization of diagnostic and treatment programs in neonatal surgery: MD author's thesis / T.V. Krasovskaya. – M., 1991.

3. Писклаков А.В. Опыт лечения новорожденных с некротизирующим энтероколитом с учетом показателей внутрибрюшного давления / А.В. Писклаков, Д.А. Федоров, Б.М. Новиков // Детская хирургия. – 2012. – №2. С.27-29.

Pisklakov A.V. Experience in treating neonates with necrotizing enterocolitis based indicators

of abdominal pressure / A.V. Pisklakov, D.A. Fedorov, B.M. Novikov // Pediatric Surgery. – 2012. – № 2. – P.27-29.

4. Лечение перфораций желудочно-кишечного тракта у новорожденных / В.В. Подкаменев, В.А. Новожилов, Д.В. Тимофеев [и др.] // Детская хирургия. – 2007. – №2. С.4-6.

Treatment of perforations of the gastrointestinal tract in neonates / V.V. Podkameney, V.A. Novozhilov, D.V. Timofeyev [et al.] // Pediatric Surgery. – 2007. – № 2. – P.4-6.

5. Altered intestinal microcirculation is the critical event in the development of necrotizing

enterocolitis / C.D. Downard, S.N. Grant, P.J. Mathenson [et al.] // J. Pediatr. Surg. – 2011. – Jun, 46 (6). – 1023-8.

6. Rees S.M. National prospective surveillance study of necrotizing enterocolitis in neonatal intensive care units / S.M. Rees, S. Eaton, A. Pierro // J. Pediatr. Surg. – 2010. – Jul, 45 (7). – 1391-7.

7. Zornoza M. Role of peritoneal drainage in necrotizing enterocolitis in critical infants with extremely low birth weight. / M. Zornoza, D. Pelaez, R. Romero // Cir. Pediatr. – 2011. – Aug., 24 (3). – 146-50.

И.Н. Николаева, А.С. Гольдерова, З.Н. Кривошапкина, Ф.А. Захарова

## УРОВЕНЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ (CD4+CD25+FOXP3+) У БОЛЬНЫХ НЕСТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ

УДК 571.27: 616.13 – 004.6 (571.56)

Роль регуляторных Т-лимфоцитов (Трег-клеток) в развитии атеросклеротических поражений сосудистой стенки является предметом исследований ведущих лабораторий. Трег-клетки выявлены в атеросклеротических бляшках сонных и коронарных артерий человека. В исследование вошли мужчины (n=16) со средним возрастом 61,5 ± 9,3 года, поступившие в отделение интенсивной терапии с диагнозом нестабильная стенокардия, и условно здоровые мужчины (n=8), сопоставимые по возрасту. Результаты сравнительного анализа показали, что у больных нестабильной стенокардией отмечаются значимое повышение Трег-клеток (CD4+CD25+FoxP3+), а также тенденция к снижению Т-хелперов (CD4+). Вероятно, данное повышение Трег-клеток подавляет дальнейшую активацию атеросклеротического процесса путем подавления пролиферации и активации Т-хелперов. Кроме этого, установлены отрицательная корреляционная связь между Трег-клетками (CD4+CD25+FoxP3+) и Т-хелперами (CD4+), а также положительная связь между Трег-клетками (CD4+CD25+FoxP3+) и ХС-ЛПНП.

**Ключевые слова:** Т-регуляторные лимфоциты, нестабильная стенокардия, атеросклероз.

The role of regulatory T-lymphocytes (Treg-cells) in development of atherosclerotic damage of vascular wall is the subject of research of world leading laboratories. Treg cells have been identified in atherosclerotic plaques of human carotid and coronary arteries. Males (n=16) aged, at the average, 61,5 ± 9,3 admitted to the intensive care unit diagnosed with unstable stenocardia and conditionally healthy males (n=8) at the similar age were included in the study. The results of the comparative analysis revealed that patients with unstable stenocardia showed a significant increase of Treg cells (CD4+CD25+FoxP3+), and a tendency towards a decrease of T helpers (CD4+). The increase of Treg cells is likely to suppress a further activity of the atherosclerotic process through suppressed proliferation and activity of T-helpers. The negative correlative link between Treg cells (CD4+CD25+FoxP3+) and T-helpers (CD4+), as well as a positive link between Treg cells (CD4+CD25+FoxP3+) and ХС-ЛПНП have been identified.

**Keywords:** T-regulatory lymphocytes, unstable stenocardia, atherosclerosis.

**Введение.** В последнее десятилетие особое место в иммунологических исследованиях занимает изучение регуляторных супрессорных Т-клеток. Впервые они были охарактеризованы S.Sakaguchi с соавт. [11] как CD4+CD25+ Т-клетки при исследованиях аутоиммунных заболеваний у мышей. Предполагается, что регуляторные Т-клетки играют существенную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Они могут подавлять активацию, пролиферацию и эффекторные функции широкого круга иммунокомпетентных клеток, включая CD4+ и CD8+ Т-

клетки, натуральные киллерные (NK) и натуральные киллерные Т (NKT)-клетки, В-клетки и антигенпрезентирующие клетки in vitro и in vivo [9,15].

Специфичным маркером Трег-клеток является внутриклеточный транскрипционный фактор FoxP3. Экспрессия данного белка определяет способность регуляторных Т-клеток ингибировать промоторную часть генов провоспалительных цитокинов [8, 13]. Регуляторные Т-клетки играют ключевую роль в иммунной системе благодаря уникальной способности контролировать иммунный ответ, они предупреждают аутоиммунные заболевания, аллергию, реакцию отторжения трансплантата, поддерживают пищевую и транспланцентарную толерантность. Эта роль впервые была установлена у мышей, у которых недостаток или удаление Трег-клеток приводили к развитию аутоиммунного гастрита, тиреоидита, диабета и

воспалительной болезни кишечника. Впоследствии во многих исследованиях было показано, что дефекты в CD4+CD25+FoxP3+ Трег-клетках могут способствовать развитию аутоиммунитета и что эти процессы отменяются адаптивным переносом Трег-клеток. Однако регуляторные Т-клетки могут играть и негативную роль в организме. Например, FoxP3+ Трег-клетки подавляют противоопухолевый иммунитет, тем самым способствуя опухолевой прогрессии [9,17].

Роль Трег-клеток в развитии атеросклеротических поражений сосудистой стенки является предметом исследований ведущих лабораторий. Трег-клетки выявлены в атеросклеротических бляшках сонных [18] и коронарных артерий человека [3,5]. На моделях атеросклероза у мышей была показана важная роль регуляторных Т-лимфоцитов в подавлении атерогенеза и стабилизации атеросклеротических

Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН: НИКОЛАЕВА Ирина Николаевна – с.н.с., irinikolaeva@mail.ru; ГОЛЬДЕРОВА Айталина Семёновна – к.м.н., руковод. отдела, hoto68@mail.ru; КРИВОШАПКИНА Зоя Николаевна – к.б.н., с.н.с., atec@mail.ru; ЗАХАРОВА Федора Аполлоновна – д.м.н., проф. МИ СВФУ им М. К. Аммосова, patfiz63@mail.ru.

поражений [14, 19]. Считают, что такое действие регуляторных Т-лимфоцитов обусловлено супрессорной активностью в отношении «проатерогенных» эффекторных Т-лимфоцитов, подавлением дифференцировки Т-хелперов 0 типа в Т-хелперы 1-го и 2-го типов, а также регуляторными Т-лимфоцитами противовоспалительных цитокинов. В дестабилизации течения ИБС определенное значение придается иммуновоспалительным реакциям. В частности, в развитии нестабильной атеросклеротической бляшки важную роль играет воспалительно-деструктивный процесс, характеризующийся значительной инфильтрацией моноцитами/макрофагами и Т-лимфоцитами, секретирующими провоспалительные цитокины [2, 12].

**Материалы и методы исследования.** В исследование включены 16 больных, поступивших в отделение интенсивной терапии и реанимации МУ «Якутской городской клинической больницы» с диагнозом нестабильная стенокардия в возрасте от 46 до 72 (средний возраст  $61,5 \pm 9,3$ ). Группу контроля составили 9 условно здоровых мужчин, сопоставимых по возрасту и не имеющих в анамнезе ИБС 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.). Группу сравнения составили 8 практически здоровых мужчин, сопоставимых по возрасту.

Забор венозной крови в объеме 7-8 мл производился утром натощак в течение первых трех суток после поступления больных в отделение реанимации и интенсивной терапии. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК-ПК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Фракцию мононуклеарных клеток отмывали (ФСБ), ресуспендировали и определяли их концентрацию. Отбирали клетки в количестве  $1 \times 10^6$  и осаждали их центрифугированием, удаляли супернатант и ресуспендировали в 100 мкл буферного раствора.

Для определения Тreg-клеток с помощью оценки экспрессии фактора транскрипции FoxP3 использовался набор FoxP3 Staining Kit-PE («BD Pharmingen»™), исследование прово-

Содержание лимфоцитов в периферической крови, %

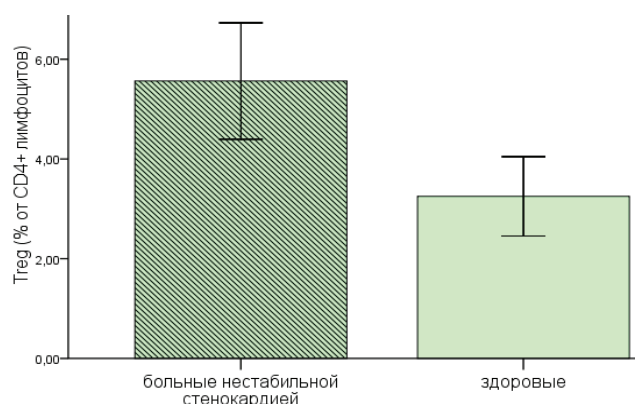
| Показатель                  | Больные нестабильной стенокардией (n=16) | Контрольная группа (n=8) | p     |
|-----------------------------|------------------------------------------|--------------------------|-------|
| Общие Т-клетки CD3+         | $66,25 \pm 3,34$                         | $69,50 \pm 4,13$         |       |
| Т-хелперы CD4+              | $39,43 \pm 2,50$                         | $45,50 \pm 1,55$         | 0,064 |
| Тreg-клетки CD4+CD25+Foxp3+ | $5,56 \pm 0,54$                          | $3,25 \pm 0,25$          | 0,039 |

дили по протоколу, представленному фирмой-производителем. Количество клеток  $1 \times 10^6$  в объеме 100 мкл ФСБ переносили в пробирку 12,75 мм («Falcon», «BD Bioscience»), к суспензии клеток добавляли по 20 мкл антител CD4 – FITC и CD25 – APC, инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре и отмывали 2 мл ФСБ, осадок ресуспендировали в остаточном объеме ФСБ. Клетки фиксировали 10 мин в 2 мл соответствующего реагента (входит в состав набора) в темноте при комнатной температуре и дважды отмывали 2 мл ФСБ. Затем к осадку добавляли 0,5 мл пермеабилizующего раствора (входит в состав набора), инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре, отмывали 2 мл ФСБ, осадок ресуспендировали в 100 мкл ФСБ. К суспензии клеток добавляли 20 мкл антител к FOXP3 и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре, затем клетки дважды отмывали 2 мл ФСБ, добавляли 200 мкл ФСБ и исследовали на проточном цитофлуориметре FACSCantoll («BD Bioscience») с использованием программного обеспечения FACSDiva («BD Immunocytometry Systems»). При обработке полученных данных на первом этапе для анализа выбирали клетки с иммунофенотипом и морфологическими признаками, соответствующими хелперным Т-лимфоцитам, определяемым по характеру бокового светорассеяния (SSC) и экспрессии CD4+. Содержание Т-регуляторных клеток определяли как долю клеток с иммунофенотипом CD25+ FoxP3+. Статистический анализ проводили с помощью «SPSS 17.0 for Windows». Равенство выборочных средних проверяли по параметрическому t-критерию Стьюдента и непараметрическому U-критерию Манна – Уитни для независимых выборок. Для определения тесно-

ты связи между изучаемыми количественными данными был проведен корреляционный анализ с вычислением коэффициентов и ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Сравнительный анализ относительного содержания Т-лимфоцитов показал, что у больных нестабильной стенокардией средние значения общих Т-лимфоцитов (CD3+) и Т-хелперов (CD4+) снижены по сравнению с контрольной группой и находятся в пределах референсных величин. Следует отметить, что в содержании Т-хелперов (CD4+) в группе больных ( $39,43 \pm 2,50\%$ ) имеется тенденция к снижению ( $p = 0,063$ ) по сравнению с контрольной группой ( $45,50 \pm 1,55\%$ ) (таблица).

Значимое различие выявлено в относительном содержании регуляторных CD4+CD25+FoxP3+ Т-лимфоцитов, у больных нестабильной стенокардией экспрессия этих клеток повышена в 1,71 раза ( $p = 0,039$ ) (рисунок). Эти данные косвенно подтверждают ранее полученные нами результаты об относительном дефиците Т-клеточного иммунитета [1] и о повышении противовоспалительного IL-10 у больных с нестабильной стенокардией по сравнению с больными со стабильной стенокардией [4]. Предполагается, что регуляторные Т-лимфоциты оказывают противовоспалительное действие и способны стабилизировать атеросклеротический процесс [10].



Столбики ошибок: 95% Дов. инт.

Содержание регуляторных Т-лимфоцитов (CD25+CD4+Foxp3+)

В настоящее время выделяют следующие субпопуляции регуляторных Т-клеток: регуляторные Т-клетки типа 1 (Tr1, type 1 regulatory T cells), Т-хелперные клетки типа 3 (Th3, type 3 helper T cells), CD8+ iTreg-клетки (induced regulatory T cells) и CD4+CD25+FoxP3+ Treg-клетки. Клетки Tr1 образуются на периферии вне тимуса и поэтому относятся к адаптивным и/или индуцибельным регуляторным Т-клеткам (iTreg). iTreg-клетки индуцируются под влиянием стимуляции активирующими агентами (в частности антигеном) и образуются в ходе иммунного ответа. Дифференцировка iTreg является антигензависимой и осуществляется при определенных условиях: в присутствии цитокинов, обладающих иммуномодулирующими свойствами, и чувствительных к этим цитокинам APC. Клетки Tr1 в основном секретируют IL-10, а также в небольших количествах TGF и IL-5. Они способны подавлять функции Th1 и Th2 как *in vitro*, так и *in vivo*. Tr1-клетки контролируют развитие аутоиммунных процессов, регулируют активацию наивных клеток и Т-клеток памяти, функции дендритных клеток (DC) и развитие иммунного ответа на различные патогены, аллоантигены, а также принимают участие в процессе опухолевого роста [6, 7]. Супрессорные свойства Tr1-клеток связаны в основном со способностью к секреции IL-10, поскольку их функции могут быть нарушены использованием анти-IL-10 моноклональным антителами (МАТ) [6].

Нами проведен корреляционный анализ, который установил следующие взаимосвязи Treg-клеток: отрицательную связь с Т-хелперами (CD4+) ( $r = -0,523$ ;  $p = 0,018$ ), а также весьма сильные положительные корреляционные связи с уровнем общего холестерина ( $r = 0,702$ ;  $p = 0,004$ ), атерогенных ХС-ЛПНП ( $r = 0,724$ ;  $p = 0,002$ ) и  $\gamma$ -глутамилтрансферазой ( $r = 0,661$ ;  $p = 0,005$ ).

Таким образом, значимое повышение уровня Treg-клеток в сыворотке больных нестабильной стенокардией позволяет предположить, что именно данное увеличение Treg-клеток подавляет дальнейшую активацию атеросклеротического процесса путем подавления пролиферации и активации Т-хелперов, в частности посредством

повышенной секреции противовоспалительного цитокина IL-10 и тем самым обеспечивает более благоприятный прогноз заболевания (исследованные больные в дальнейшем выписались с улучшением состояния). Полученные нами данные требуют дальнейшего изучения.

## Литература

1. Гольдерова А.С. Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах у больных ИБС в условиях Якутии / А.С. Гольдерова, И.Н. Николаева, В.А. Козлов // Якутский медицинский журнал. – 2012. – №3. – С. 59-62.
2. Golderova A.S. Expression of Superficial Markers in Lymphocytes of Patients with IHD in Yakutia / A.S. Golderova, I.N. Nikolaeva, V.A. Kozlov // Yakut Journal of Medicine. – 2012. – №3. – P. 59-62. (In Russian)
3. Изменение содержания провоспалительных цитокинов и деструктивных металлопротеиназ в процессе развития атеросклеротического очага до нестабильной бляшки / Ю.И. Рагино, А.М. Чернявский, Я.В. Полонская [и др.] // Кардиология. – 2010. – № 6. – С. 43 – 50.
4. Change of Content of Anti Inflammatory Cytokines and Destructive Metalloprotease in Process of Atherosclerotic Focus Development into Unstable Plaque / Yu.I. Ragino, A.M. Chernyavski, Ya.V. Polonskaya [et. al.] // Cardiology. – 2010. – № 6. – P. 43 – 50.
5. Изменение содержания регуляторных Т-лимфоцитов и концентрации растворимого рецептора интерлейкина -2 в крови больных ишемической болезнью после ангиопластики коронарных артерий с имплантацией стентов с рапамициновым покрытием / А.В.Потехина, В.О. Соколов, Е.А. Пылаева [и др.] // Там же. – 2011. – №3. – С. 47-52.
6. Change of Content of Regulatory T lymphocytes and Concentration of soluble Receptor Interleukin 2 in Blood of Patients with Ischemic Disease after Angioplasty of Coronary Arteries with Implantation of Stents with Rapamycin Coating / A.V.Potekhin, V.O. Sokolov, E.A. Pylaeva [et. al.] // Ibid. – 2011. – №3. – P. 47-52.
7. Особенности продукции цитокинов больных нестабильной стенокардией в зависимости от этнической принадлежности в Республике Саха (Якутия) / А.С. Гольдерова, И.Н. Николаева, В.Е. Тарасова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, №1-2. – С.143-148.
8. Peculiarities of Cytokine Production in Patients with Unstable Stenocardia in Ethnic Correlation in Sakha Republic (Yakutia) / A.S. Golderova, I.N. Nikolaeva, V.E. Tarasova [et. al.] // Medical Immunology – 2012. – V.14. – №1-2. – P.143-148.
9. Экспрессия маркеров регуляторных CD4+CD25+FoxP3+ клеток в атеросклеротических бляшках / В.О. Соколов, Т.Л. Красникова, Л.В. Прокофьева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии. – 2009. – №147. – С.667-670.

Expression of Markers of Regulatory CD4+CD25+FoxP3+ Cells in Atherosclerotic Plaques / V.O. Sokolov, T.L. Krasnikova, L.V. Prokofieva [et. al.] // Bulletin of Experimental Biology. – 2009. – №147. – P.667-670.

6. Beissert S. Regulatory T-cells / S. Beissert, A. Schwarz, T. Schwarz // J. Invest. Dermatol. – 2006. – Vol. 126. – P. 15–24.
7. Fehervari Z. CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy / Z. Fehervari, S. Sakaguchi // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2005. – Vol. 360. – P. 1647–1661.
8. Fontenot J.D. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells / J.D. Fontenot, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky // Nat. Immunol. – 2003. – Vol.4. – P. 330–336.
9. FoxP3+ regulatory T-cells in the human immune system / S. Sakaguchi, M. Miyara, C.M. Costantino [et. al.] // Nat. Rev. Immunol. – 2010. – Vol. 10. – №7. – P.490-500.
10. Galkina E. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis / E. Galkina, K. Ley // Ann Rev Immunol. – 2009. – Vol. 27. – P.165-197.
11. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self – tolerance causes various autoimmune diseases / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano [et al.] // J. Immunol. – 1995. – Vol. 155. – P. 1151–1164.
12. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice / P. Libby, Y. Okamoto, V.Z. Rocha [et al.] // Circulation. – 2010. – Vol. 74. – P.213 – 220.
13. Ramsdell F. FoxP3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? // Immunity. – 2003. – Vol. 19. – P. 165–168.
14. Role naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T-cells in experimental atherosclerosis / A. Mor, D. Planer, G. Luboshits [et al.] // Arterioscler Thrombo Vasc Biol. – 2007. – №27. – P.893-900.
15. Shevach E.M. Mechanisms of FoxP3+ T regulatory cell-mediated suppression / E.M. Shevach // Immunity. – 2009. – Vol. 30. – P. 636–645.
16. Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease: heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis / K. Shimada // Circ J. – 2009. – Vol.73. – P.994-1001.
17. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival / T.J. Curiel, G. Coukos, L. Zou [et al.] // Nat. Med. 2004. Vol. 10. P.942–949.
18. The «atheroprotective» mediators apolipoprotein A-I and FoxP3 are over-abundant in unstable carotid plaques / S. Patel, S.H. Chung, G. White [et al.] // Int J Cardiology. – 2009/ may 28.
19. Treg-mediated suppression of atherosclerosis requires MYD88 signaling in DCs / M. Subramanian, E. Thorp, G.K. Hansson [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. – 2013. – Vol. 123. – №1. – P.179-188.