

Липопротеид(а), аутоантитела к нему и циркулирующие субпопуляции Т-лимфоцитов как независимые факторы риска атеросклероза коронарных артерий

О.И. АФАНАСЬЕВА, Е.А. ПЫЛАЕВА, Е.А. КЛЕСАРЕВА, А.В. ПОТЕХИНА, С.И. ПРОВАТОРОВ, М.И. АФАНАСЬЕВА, Т.Л. КРАСНИКОВА, В.П. МАСЕНКО, Т.И. АРЕФЬЕВА, С.Н. ПОКРОВСКИЙ

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Цель исследования — изучить роль липопротеида(а) [Лп(а)] как потенциального аутоантигена, вызывающего активацию иммунокомпетентных клеток при атеросклерозе.

Материалы и методы. Обследовали 104 мужчин со стабильной формой ишемической болезни сердца и различной степенью прогрессии коронарного атеросклероза. Выполняли общий анализ крови и определение субпопуляций лимфоцитов (CD4⁺, Th1, Th17, Treg) с помощью иммунофлуоресценции и поточной цитометрии. Кроме того, измеряли показатели липидного состава крови, Лп(а), титр аутоантител (аутоАТ) к Лп(а) и липопротеиды низкой плотности (ЛНП), маркер активации лимфоцитов sCD25.

Результаты. Уровень Лп(а) являлся предиктором тяжести поражений коронарных артерий — КА ($\beta=0,28$; $p<0,05$) независимо от возраста, уровня холестерина, содержания различных субпопуляций Т-лимфоцитов, sCD25 и аутоАТ. Сочетание у пациента концентрации Лп(а) более 11,8 мг/дл и Th17 более 11,4 тыс./мл как и сниженных показателей регуляторных Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов CD4⁺, продуцирующих интерлейкин-10, многократно увеличивало риск развития тяжелого и прогрессирующего атеросклероза КА. Выявлена прямая взаимосвязь содержания в крови Th1 с уровнем аутоАТ класса IgG, специфичных ко всем атерогенным Лп, содержащим апоВ, включая Лп(а). Обнаружена обратная взаимосвязь показателя активации лимфоцитов sCD25 с титром аутоАТ класса IgM, специфичных к Лп(а) ($r=-0,36$; $p<0,005$), менее выраженную — к нативным и окисленным ЛНП ($r=-0,21$ и $r=-0,24$; $p<0,05$ соответственно).

Заключение. Впервые показано, что незначительно повышенная концентрация Лп(а) на фоне сдвигов в содержании субпопуляций Т-лимфоцитов значительно потенцирует риск прогрессирующего и множественного поражения КА у обследованных больных. Взаимосвязь аутоАТ к Лп(а) класса IgM с маркером активации лимфоцитов sCD25 и аутоАТ класса IgG к Th1 демонстрируют участие Лп(а) в процессах аутоиммунного воспаления при атеросклерозе.

Ключевые слова: липопротеид(а), аутоантитела, Т-лимфоциты, атеросклероз, коронарные артерии.

Lipoprotein(a), its autoantibodies, and circulating T lymphocyte subpopulations as independent risk factors for coronary artery atherosclerosis

O.I. AFANASIEVA, E.A. PYLAEVA, E.A. KLESAREVA, A.V. POTEKHINA, S.I. PROVATOROV, M.I. AFANASIEVA, T.L. KRASNIKOVA, V.P. MASENKO, T.I. AREFIEVA, S.N. POKROVSKY

Russian Cardiology Research and Production Complex, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Aim. To study the role of lipoprotein(a) [Lp(a)] as a potential autoantigen causing the activation of immunocompetent cells in atherosclerosis.

Subjects and methods. A total of 104 men with stable coronary artery (CA) disease and different degrees of progressive coronary atherosclerosis were examined. Clinical blood analysis was carried out and lymphocyte subpopulations (CD4⁺, Th1, Th17, and Treg) were determined using immunofluorescence and flow cytometry. In addition, the indicators of blood lipid composition, Lp(a), autoantibody (autoAb) titer to Lp(a), and low-density lipoproteins (LDL), and the lymphocyte activation marker sCD25 were also measured.

Results. The Lp(a) level was shown to predict the severity of CA lesions ($\beta=0.28$, $p<0.05$), regardless of age, the level of cholesterol, different T-lymphocyte subpopulations, sCD25, and autoAb. A combination of the concentration of Lp(a) above 11.8 mg/dl, that of Th17 over $11.4 \cdot 10^3$ cells/ml and the reduced levels of regulatory T cells and IL-10-producing CD4⁺ T cells showed a manifold increase in the risk of severe and progressive CA atherosclerosis. There was a direct correlation of the blood level of Th1 with that of IgG autoAb specific to all atherogenic apoB-containing lipoproteins, including Lp(a). There was an inverse correlations of the lymphocyte activation marker sCD25 with IgM anti-Lp(a) autoAb titers ($r=-0.36$; $p<0.005$), but this was less significant with autoAbs to native and oxidized LDL ($r=-0.21$ and $r=-0.24$; $p<0.05$, respectively).

Conclusion. The slightly elevated Lp(a) concentration along with changes in the level of T lymphocyte subpopulations was first shown to significantly potentiate the risk of progressive and multiple CA lesion in the examinees. The correlation of IgM anti-Lp(a) autoAb with the lymphocyte activation marker sCD25 and that of IgG anti-Lp(a) autoAb with Th1 have demonstrated that Lp(a) is involved in the autoimmune inflammatory processes in atherosclerosis.

Keywords: lipoprotein(a) [Lp(a)], anti-Lp(a) autoantibodies, T lymphocytes, atherosclerosis, coronary arteries.

апо(а) — апобелок(а)
АТ — антитела
аутоАТ — аутоантитела
ДИ — доверительный интервал

ИБС — ишемическая болезнь сердца
ИЛ — интерлейкин
ИФА — иммуноферментный анализ
КА — коронарные артерии

КГ — коронарография
ЛНП — липопротеиды низкой плотности,
Лп(а) — липопротеид(а)
окЛНП — окисленный ЛНП
ОХС — общий холестерин

ОШ — отношение шансов
ТГ — триглицериды
Th17 — Т-хелперы 17-го типа
sCD25 — растворимая форма рецептора CD25
Th1 — Т-хелперы 1-го типа

Хронический воспалительный процесс, развивающийся в стенке артерий на фоне нарушения липидного обмена и повреждения эндотелия, является одной из основных составляющих атеросклеротического процесса. Воспаление сопровождается накоплением лейкоцитов в интиме и продукцией широкого спектра цитокинов и других биологически активных веществ, способствующих ремоделированию стенки сосуда и формированию атеросклеротического поражения.

В атеросклеротических бляшках человека локализованы макрофаги и Т-лимфоциты, среди которых преобладают Т-хелперные клетки 1-го типа (Th1), играющие предположительно проатерогенную роль [1, 2]. Полагают, что Т-лимфоциты «узнают» аутоантигены, представленные макрофагами и дендритными клетками, и продуцируют цитокины, вызывающие активацию макрофагов, лимфоцитов и гладких мышечных клеток, которые в свою очередь способствуют дальнейшему привлечению лейкоцитов в стенку сосуда [3]. Проатерогенным действием согласно ряду экспериментальных работ [4] обладают также Т-хелперы 17-го типа (Th17) — недавно открытая субпопуляция лимфоцитов CD4+, продуцирующая интерлейкин (ИЛ) 17. Th17 принимают участие в иммунной реакции против собственных и чужеродных антигенов путем привлечения в очаг воспаления клеток миелоидного ряда, активации лимфоцитов и секреции провоспалительных цитокинов [5]. По данным немногочисленных клинических исследований, активация Th17 или повышение количества этих клеток в кровотоке может быть связано с прогрессированием атеросклероза и возникновением осложнений ишемической болезни сердца (ИБС) [6].

В качестве потенциальных аутоантигенов в атерогенезе чаще всего упоминаются модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛНП), например окисленные или альдегидмодифицированные ЛНП, а также липопро-

теиды, содержащие окисленные фосфолипиды (окЛНП) [7–9]. Повышенный уровень в крови аутоантител (ауто-АТ) к окЛНП ассоциирован с ангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом [10] и повышенным риском прогрессирования атеросклероза сонных артерий [11].

Липопротеид(а) [Лп(а)] представляет собой сложный надмолекулярный комплекс, в котором апобелок В100 ЛНП-подобной частицы соединен дисульфидной связью с молекулой апобелка(а) [апо(а)], гомологичного молекуле плазминогена. В отличие от других липопротеидов уровень Лп(а) в крови контролируется генетически, варьирует в очень широком диапазоне и устойчив к медикаментозной терапии. Доказано, что повышенная концентрация Лп(а) в плазме является независимым фактором риска возникновения и развития атеросклеротических поражений различной локализации [12, 13]. Концентрация Лп(а) более 30 мг/дл отмечена у 38–42% индивидуумов с высоким риском развития ИБС (по шкале National Cholesterol Education Program) и только у 14% пациентов без такого риска [14, 15].

Накопление Лп(а) в атеросклеротических бляшках коронарных артерий (КА) и сонных артерий, начиная с момента образования липидных полос [16, 17], позволяет предположить выраженное «проатерогенное» действие данного липопротеида. Обнаруженная в нашей предыдущей работе связь аутоАТ к Лп(а) с наличием и степенью тяжести коронарного атеросклероза может свидетельствовать об участии Лп(а) в атерогенезе на уровне гуморального и клеточного иммунитета [18].

Цель настоящей работы состояла в изучении роли Лп(а) как потенциального аутоантигена, вызывающего активацию иммунокомпетентных клеток при атеросклерозе.

Материалы и методы

В одномоментное ретроспективное исследование включили 104 мужчин с различной степенью атеросклероза КА, верифицированного ангиографически. В исследование не включали пациентов с острым коронарным синдромом и перенесенным в течение последних 6 мес инфарктом миокарда, мозговым инсультом, операцией коронарного шунтирования или транслуминальной баллонной ангиопластики КА, острыми или хроническими воспалительными заболеваниями, онкологическими заболеваниями, хронической почечной или печеночной недостаточностью, сахарным диабетом.

Уровень общего холестерина (ОХС) и триглицеридов (ТГ) в плазме крови измеряли с использованием реагентов Вюсоп (Германия) ферментативным колориметрическим методом. Концен-

Контактная информация:

Афанасьева Ольга Ильинична — д.б.н., в.н.с. лаб. проблем атеросклероза, Институт экспериментальной кардиологии; 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а; тел.: +7(495)414-6732; e-mail: Afanasieva@cardio.ru

Сведения об авторах:

Пылаева Екатерина Алексеевна — аспирант отд. хронической ИБС, Институт клинической кардиологии

Клесарева Елена Александровна — к.т.н., лаб. проблем атеросклероза, институт экспериментальной кардиологии

Потехина Александра Викторовна — м.н.с., отд. хронической ИБС, Институт клинической кардиологии

Проваторов Сергей Ильич — с.н.с., отд. хронической ИБС, Институт клинической кардиологии

Афанасьева Марина Ильинична — н.с. лаб. проблем атеросклероза, Институт экспериментальной кардиологии

Красникова Татьяна Леонидовна — в.н.с., лаб. клеточной иммунологии, Институт экспериментальной кардиологии

Масенко Валерий Павлович — рук. отд. нейрогуморальных и иммунологических исследований, Институт клинической кардиологии

Арефьева Татьяна Игоревна — зав. лаб. клеточной иммунологии, Институт экспериментальной кардиологии

Покровский Сергей Николаевич — д.б.н., проф., рук. лаб. проблем атеросклероза, Институт экспериментальной кардиологии

трацию Лп(а) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноспецифических поликлональных антител (АТ) барана против Лп(а) человека, как описано ранее [19]. Уровень специфических аутоАТ к Лп(а) оценивали методом твердофазного ИФА по методике, описанной ранее [18]. В качестве проявляющих АТ использовали иммуноглобулины козы к иммуноглобулинам G или M человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Мононуклеарные клетки выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности по методике Воуит [20]. Клетки концентрации 5 млн/мл ресуспендировали в среде RPMI 1640, содержащей 5% пулированной сыворотки человека. Для активации клеток в культуру вносили 25 нг/мл форболмирилатацетата, 1 мкг/мл иономицина и 10 мкг/мл монензина (все реактивы Sigma, США). Клетки инкубировали 5 ч при температуре 37 °С и 5% CO₂.

Имунофенотипирование клеток осуществляли методом цитофлуориметрии в потоке, для выявления поверхностных антигенов использовали флуоресцентно меченные моноклональные АТ CD4-FITC, CD4-PC5, CD25-PC5, CD127-PE (Becton Dickinson Immunocytometry Systems — BDIS — фирм «Becton Dickinson & Co» и «Bioscience», США). Для идентификации внутриклеточных белков использовали наборы для фиксации и пермеабиллизации клеток и флуоресцентно меченные АТ (интерлейкин — ИЛ-17-PE, ИЛ-10-PE и ИНФ-γ-FITC (все реактивы фирмы «Bioscience», США). Окрашивание клеток АТ к цитокинам проводили после активации в культуре. Лизис эритроцитов, окрашивание лейкоцитов, фиксацию и пермеабиллизацию клеток осуществляли в соответствии с протоколами производителей. Флуоресценцию клеток измеряли методом цитофлуориметрии в потоке (FACSCalibur, BDIS). Лимфоциты выделяли по параметрам светорассеяния. Т_{рег} типировали как Т-лимфоциты CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, активированные Т-хелперы [Т_{акт}] — как CD4⁺CD25^{low} [21], Th1 и Th17 — как CD4⁺ИНФ-γ⁺ и Т-лимфоциты CD4⁺ИЛ-17⁺ соответственно, Т-клетки, продуцирующие ИЛ-10, — как Т-лимфоциты CD4⁺ИЛ-10⁺.

Концентрацию sCD25 в сыворотке крови определяли хемилюминесцентным методом на анализаторе Immulite 1000 (DPC, «Siemens», Германия). Концентрацию С-реактивного белка измеряли высокочувствительным методом на нефелометре Bering Marburg GmbH, Dade (Германия — США).

Статистический анализ данных выполняли с помощью пакетов статистических программ Statistica 8.0 и MedCalc 12.5.0. Нормальный характер распределений доказывали с помощью критерия Шапиро—Уилка, данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. При несоответствии распределения данных нормальному закону для их описания использовали медиану и межквартильный интервал. Для множественного межгруппового сравнения в случае нормально распределенных данных использовали критерий *t* Стьюдента, в случае несоответствия нормальному закону — тест медиан и критерий Крускала—Уоллиса. Для попарных межгрупповых сравнений в случае нормально распределенных данных использовали критерий *t* Стьюдента, в случае несоответствия нормальному закону — критерий *U* Манна—Уитни. Для сравнения распределений порядковых и номинальных признаков применяли критерий χ². Для анализа взаимосвязи Лп(а) и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов с коронарным атеросклерозом рассчитывали отношение шансов (ОШ) при сравнении подгрупп с показателями меньше и равно и более медианы для каждого параметра в исследованной когорте в целом. Анализ проводили в группе с прогрессирующим и тяжелым атеросклерозом (объединенная 3-я и 4-я группа) по сравнению с пациентами с малоизмененными КА (1-я группа). Корреляционный анализ по Спирмену и Пирсону, а также множественный регрессионный анализ использовали для изучения связи между показателями. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0,05.

Результаты и обсуждение

По данным коронарографии (КГ) сформировали 4 группы пациентов: 1-я — 20 больных с малоизмененными

и/или без клинически значимого поражения (менее 50% просвета сосуда) КА, 2-я — 33 пациента без прогрессирования атеросклероза в течение 23,8±8,4 мес наблюдения, 3-я — 19 пациентов с прогрессированием коронарного атеросклероза в течение 22,4±8,7 мес наблюдения, 4-я — 31 пациент с трехсосудистым поражением коронарного русла. Во 2-ю и 3-ю группы включали больных, перенесших коронарное стентирование за 2 года до включения в исследование. Под прогрессированием коронарного атеросклероза понимали появление новых стенозированных поражений КА, суживающих на 50% и более просвет сосуда, либо увеличение выраженности ранее отмеченного стеноза на 30% и более, в артериях, ранее не подвергавшихся вмешательству. Группы статистически значимо не различались по основным клиническим и лабораторным характеристикам (табл. 1). В 1-й группе в отличие от остальных отсутствовали случаи ИМ. В 4-й группе по сравнению с 1-й было статистически значимо больше курьезиков.

В обследованной группе больных концентрация Лп(а) в крови связана с тяжестью поражения КА по данным однофакторного анализа (*r*=0,24; *p*=0,019). Кроме того, по данным многофакторного корреляционного анализа, концентрация Лп(а) является предиктором тяжести поражений КА (*β*=0,28; *p*<0,005) независимо от возраста, уровня ОХС и ТГ, концентрации глюкозы, содержания Th17, маркера активации лимфоцитов sCD25, субпопуляций Т-лимфоцитов и других исследуемых показателей.

Уровень Лп(а) в плазме крови в группе больных с многососудистым поражением оказался достоверно выше, чем в группе пациентов с малоизмененными КА (38,3±44,8 и 12,3±13,4 мг/дл соответственно) (рис. 1).

Не обнаружено статистически значимых различий по показателям клеточного иммунитета, а также по распределению субпопуляций лимфоцитов, за исключением уменьшения относительного содержания Т_{рег} (в процентах от количества Т-лимфоцитов CD4⁺) в группах с более тяжелым поражением КА (табл. 2). Мы также наблюдали

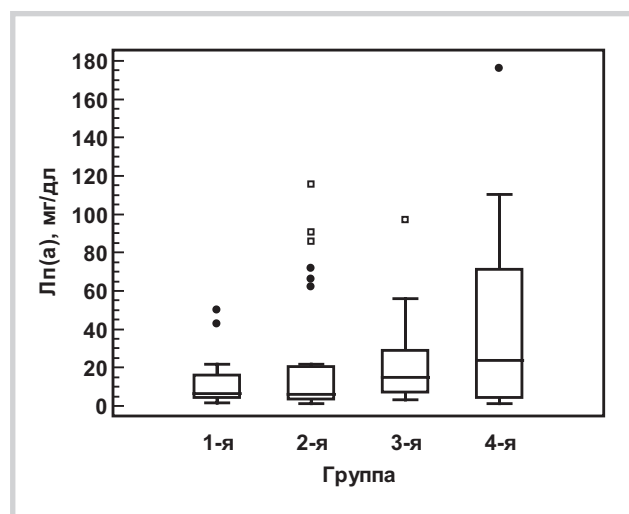


Рис. 1. Уровень Лп(а) у больных с различной степенью поражения КА.

Здесь и на рис. 2: данные представлены как среднее (точка), медиана (линия), межквартильный (прямоугольник) и 95% ДИ (усы) для медианы.

тенденцию к увеличению концентрации sCD25 (растворимой формы рецептора ИЛ-2), свидетельствующей об активации лимфоцитов.

Уровень Лп(а) не связан ни с одним из исследуемых биохимических и клеточных показателей, за исключением концентрации ОХС ($r=0,214$; $p<0,05$), что объясняется включением ХС Лп(а) в уровень ОХС. Кроме того, на данной выборке больных мы не обнаружили взаимосвязи Лп(а) и титра аутоАТ как к Лп(а), так и к ЛНП и их окисленным производным.

Для анализа взаимного влияния Лп(а) и показателей клеточного иммунитета как возможных независимых факторов риска развития атеросклероза проанализированы подгруппы больных, разделенных относительно медианы изучаемых показателей клеточного иммунитета и Лп(а), а также их сочетания. Показано, что у больных с концентрацией Лп(а) более 11,8 мг/дл (отношение шансов — ОШ 2,76 при 95% доверительном интервале — ДИ от 0,92 до 8,31) и абсолютной концентрацией в крови Th17 $\geq 11,4$ тыс/мл (ОШ 2,67 при 95% ДИ от 0,84 до 8,46) наблюдается риск прогрессирующего и множественного поражения КА по сравнению с больными, у которых концентрация показателей ниже медианы. Напротив, относительное содержание (в процентах от Т-лимфоцитов CD4+) $T_{reg} \geq 4,3\%$, Th1 $\geq 20\%$ и Т-лимфоцитов, продуцирующих ИЛ-10, $\geq 3,6\%$ демонстрировало тенденцию к двукратному предотвращению развития тяжелого и прогрессирующего атеросклероза КА в обследованной группе больных (табл. 3).

Сочетание повышенной концентрации Лп(а) и повышенного содержания в крови Th17 увеличивало риск развития тяжелого и прогрессирующего атеросклероза многократно (ОШ 10,0 при 95% ДИ от 1,03 до 97,05; $p<0,05$) (табл. 4). Наличие концентрации Лп(а) более 11,8 мг/дл на фоне сниженных показателей T_{reg} и Т-лимфоцитов CD4+, продуцирующих ИЛ-10, также достоверно увеличивало вероятность множественного и прогрессирующего атеросклеротического поражения КА (см. табл. 4).

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что повышенная концентрация Лп(а) на фоне сдвигов в содержании про- и противовоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов значительно потенцирует риск быстро прогрессирующего и множественного поражения КА.

Титр аутоАТ к Лп(а), относящихся к классу IgM, у пациентов с малоизмененными КА оказался незначительно выше, чем у пациентов с различной степенью поражения сосудистого русла ($0,095 \pm 0,024$ и $0,085 \pm 0,018$ опт. ед. соответственно; $p<0,05$), хотя межгрупповые различия не достигали статистической значимости. Для аутоАТ класса IgM к ЛНП и окЛНП статистически значимых различий не обнаруживалось. Уровень аутоАТ класса IgG как к Лп(а), так и к ЛНП и их окисленным производным демонстрировал тенденцию к последовательному увеличению по мере нарастания тяжести поражения КА, что согласовалось с ранее полученными результатами [18], и в группе больных с трехсосудистым поражением был достоверно выше, чем у больных без прогрессирования атеросклероза (см. табл. 2).

Абсолютное содержание Th1 коррелировало с уровнями аутоАТ класса IgG, специфичных ко всем исследованным в нашей работе атерогенным липопротеидам: Лп(а) ($r=0,213$; $p<0,05$), окЛп(а) ($r=0,337$; $p<0,001$), ЛНП ($r=0,233$; $p<0,05$) и окЛНП ($r=0,262$; $p<0,05$), что подтверждало участие Лп(а) в гуморальном и клеточном адаптивном ответе, в регуляции которого вовлечены Th1. Такая взаимосвязь может объясняться способностью Th1 активировать продукцию IgG, относящихся ко 2-му подклассу (IgG₂), В-клетками [22].

У пациентов с уровнем аутоАТ класса IgG к окЛНП, превышающим медиану, выявлялась тенденция к более частому тяжелому поражению коронарного русла (ОШ 1,57 при 96% ДИ от 0,55 до 4,49), тогда как при сочетанном повышении уровня аутоАТ к окЛНП на фоне увеличенной концентрации Лп(а) больные с множественным и прогрессирующим поражением КА встречались в исследованной нами когорте в 4,7 раза чаще (ОШ 4,66 при 95% ДИ от 0,94 до 23,09).

Таблица 1. Характеристика больных, включенных в исследование

Показатель	Группа			
	без поражения КА		с коронарным атеросклерозом	
	1-я (n=20)	2-я (n=33)	3-я (n=19)	4-я (n=31)
Возраст, годы	61±12	62±12	61±11	63±10
Анамнез ИМ	0	10 (30)	11 (52)	18 (62)
Курение	6 (28)	12 (36)	8 (38)	17 (59)
ОХС, ммоль/л	4,8±1,1	4,8±0,8	4,9±1,1	4,7±1,2
ТГ, ммоль/л	1,6±0,7	2,0±1,2	2,0±1,1	1,7±0,7
Глюкоза, ммоль/л	5,7±0,8	5,4±1,1	5,8±1,2	5,4±1,1
Лп(а), мг/дл	12,3±13,3	22,1±30,9	22,5±22,7*	38,3±44,8
	6,4 (3,7; 17,5)	8,4 (3,1; 20,6)	14,9 (6,1; 30,8)	24,0 (4,1; 71,4)
КА, подвергшиеся вмешательству				
ПНА	—	16 (48)	14 (67)	—
ПКА	—	12 (36)	11 (52)	—
ОА	—	8 (24)	5 (24)	—

Примечание. Данные представлены как абсолютное число больных (%) или среднее ± стандартное отклонение, для Лп(а) дополнительно даны медиана и межквартильный интервал. * — $p<0,05$ по сравнению с 1-й группой при межгрупповом сравнении непараметрическими методами. ИМ — инфаркт миокарда; ПНА — передняя нисходящая артерия; ПКА — правая коронарная артерия; ОА — огибающая артерия.

Следует отметить статистически значимую обратную связь между концентрацией sCD25 и уровнем аутоАТ к Лп(а) и ЛНП. sCD25 — растворимая («отщепленная» с поверхности клетки) форма рецептора ИЛ-2. Основным источником sCD25 являются активированные лимфоциты [23], и уровень sCD25 значительно повышается при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях [24]. Наиболее выраженной такая корреляция является для аутоАТ класса IgM, специфичных к Лп(а) ($r=-0,36$; $p<0,005$), менее выраженной — для ЛНПи окЛНП ($r=-0,21$ и $r=-0,24$; $p<0,05$ соответственно; рис. 2).

У пациентов с уровнем IgM к Лп(а), равным медиане или превышающем ее (0,085 опт. ед.), тяжелое и прогрессирующее поражение КА встречалось в 3 раза реже, чем у пациентов, имеющих сниженный уровень аутоАТ (ОШ

0,33 при 95% ДИ от 0,10 до 1,06). При сочетанном повышении концентрации Лп(а) более 11,8 мг/дл и сниженном уровне IgM частота многососудистого и прогрессирующего атеросклероза увеличивалась семикратно (ОШ 6,90 при 95% ДИ от 1,26 до 38,44; $p<0,05$). Подобные, но менее выраженные и статистически незначимые закономерности наблюдались и для аутоАТ к ЛНП, как нативным, так и окисленным медью.

Полученные нами результаты относительно аутоАТ согласуются с результатами недавнего исследования, демонстрирующими, что аутоАТ к окЛНП класса IgM и вырабатываемые клетками B_1 могут оказывать кардиопротективное действие, в то время как вырабатываемые клетками B_2 IgG и образуемые ими иммунные комплексы являются проатерогенными [25, 26].

Таблица 2. Показатели клеточного иммунитета и титр аутоАТ к атерогенным липопротеидам у больных с различной тяжестью коронарного атеросклероза

Параметр	Группа			
	без поражения КА		с коронарным атеросклерозом	
	1-я (n=20)	2-я (n=33)	3-я (n=19)	4-я (n=31)
Лейкоциты, 10^6 /мл	7,2±1,7	7,0±1,5	7,7±1,6	7,6±2,3
Лимфоциты, % от лейкоцитов	33,5±7,8	32,8±8,8	33,1±6,9	30,8±7,8
sCD25, ед/мл	643,7±235,4	765,2±362,9	717±316,3	786,8±251,8
Th1, тыс./мл	225±143 187 (141; 347)	190±141,5 177 (87; 257)	225,7±199,2 197 (153; 290)	192,4±118,7 182 (109; 265)
Th17, тыс./мл	14,9±16,9 9,2 (5,7; 18,4)	12,8±11,4 8,4 (6,2; 16,6)	19,8±19,4 14,2 (8,4; 18,1)	15,1±12,3 12,2 (8,2; 17,1)
Т-лимфоциты CD4 ⁺ , % от лимфоцитов	39,1±6,8 37 (36; 43)	37,5±8,7 36 (31; 44)	38,7±9,2 37 (34; 43)	40±9,6 43 (34; 47)
T _{акт} ⁺ , % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	41,7±11,8 43 (33; 50)	41,0±11,9 39 (30; 50)	38,0±13,1 38 (27; 48)	34,9±9,2 35 (26; 43)
T _{рег} ⁺ , % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	5,2±1,7 4,8 (3,8; 6,7)	4,5±1,9 4,3 (3,6; 5,7)	4,9±1,9 4,6 (3,2; 6,6)	4,2±1,8 4,0 (3,4; 5,8)*
Th17, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	1,5±1,5 1,1 (0,9; 1,5)	1,4±1,0 1,1 (0,7; 1,9)	1,8±2,0 1,3 (0,9; 1,8)	1,5±0,8 1,4 (0,8; 2,0)
Th1, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	25,1±14,0 24,4 (15; 36)	19,6±1,0 21,0 (13; 25)	21,5±11,5 24,2 (13; 28)	18,7±8,3 17,4 (14; 22)
Th1/T _{рег}	6,0±5,2 4,0 (3,0; 8,0)	5,4±4,8 4,9 (2,3; 7,1)	6,1±5,1 3,8 (3,0; 8,6)	5,4±3,8 3,9 (3,1; 6,5)
T _{рег} ⁺ /Th17	6,7±6,9 3,9 (3,3; 8,8)	7,2±10,7 3,2 (2,4; 7,9)	4,1±2,9 3,4 (1,9; 6,4)	4,1±3,15 4,0 (1,7; 5,6)
T _{акт} ⁺ /T _{рег}	8,8±3,8 7,9 (6,0; 11,4)	10,0±5,0 9,2 (6,0; 13,1)	8,7±3,3 8,2 (6,3; 10,2)	10,0±6,5 10,0 (5,9; 11,4)
СРБ, мг/л	3,2±3,6 1,9 (1,3; 4,1)	2,2±2,8 1,1 (0,7; 2,2)	4,0±6,1 1,4 (0,8; 6,2)	5,5±8,1 2,6 (0,9; 7,0)
АутоАТ, опт. ед. к:				
Лп(а) IgG	0,213±0,101	0,174±0,100	0,203±0,100	0,225±0,100**
Лп(а) IgM	0,095±0,02	0,084±0,02	0,087±0,01	0,085±0,02
окЛп(а) IgG	0,244±0,12	0,203±0,11	0,212±0,10	0,245±0,11
окЛп(а) IgM	0,147±0,04	0,147±0,06	0,144±0,02	0,144±0,03
ЛНП IgG	0,210±0,10	0,173±0,06	0,189±0,07	0,214±0,100**
ЛНП IgM	0,093±0,02	0,091±0,03	0,095±0,02	0,090±0,02
окЛНП IgG	0,248±0,14	0,211±0,11	0,225±0,10	0,258±0,12
окЛНП IgM	0,150±0,05	0,135±0,04	0,149±0,05	0,152±0,05

Примечание. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение и медиана (межквартильный интервал). Различия достоверны ($p<0,05$) при межгрупповом сравнении непараметрическими методами по сравнению с показателями * — в 1-й группе, ** — во 2-й группе. sCD25 — растворимая форма рецептора CD25; T_{акт}⁺ — активированные Т-лимфоциты; T_{рег}⁺ — регуляторные Т клетки; Th1/T_{рег} — отношение Th1 к T_{рег}⁺; T_{рег}⁺/Th17 — отношение T_{рег}⁺/Th17; T_{акт}⁺/T_{рег} — отношение T_{акт}⁺ к T_{рег}⁺; СРБ — С-реактивный белок; ок — окисленный; IgG — иммуноглобулины G; IgM — иммуноглобулины M; опт. ед. — оптические единицы при длине волны 492 нм.

Полагают, что аутоАТ к модифицированным ЛНП, принадлежащие к классу IgM, могут относиться к так называемым естественным аутоАТ, которые являются частью защитного врожденного иммунного ответа. Согласно результатам, полученным в экспериментах с использованием животных моделей, аутоАТ к модифицированным ЛНП и окЛНП, принадлежащие к классу IgM, могут предотвращать развитие атеросклероза, в частности за счет ингибирования захвата окЛНП макрофагами. Причем защитный потенциал таких АТ в значительной степени зависит от их способности распознавать специфические окисленные эпитопы как на ЛНП, так и на апоптотических клетках. Напротив, аутоАТ к окЛНП класса IgG могут активировать макрофаги, взаимодействуя с их рецептором Fcγ, тем самым ускоряя развитие атеросклероза [27].

Заключение

В результате нашей работы впервые показано, что даже незначительно повышенная концентрация Лп(а) более 11,8 мг/дл на фоне сдвигов в содержании субпопуляций Т-лимфоцитов значительно потенцирует риск быстро прогрессирующего и множественного поражения КА у обследованных больных. Связь титра аутоАТ к Лп(а) класса IgM с маркером активации лимфоцитов и аутоАТ класса IgG с Th1, по нашему мнению, демонстрируют участие именно Лп(а) в процессах аутоиммунного воспаления при атеросклерозе.

Конфликт интересов отсутствует.

Таблица 3. ОШ выявления тяжелого и прогрессирующего атеросклероза у пациентов с уровнем клеточных показателей иммунитета, равном или более медианы, относительно пациентов с уровнем меньше медианы

Показатель	Медиана	ОШ (95% ДИ)
Лейкоциты, 10 ⁶ /мл	7,2	1,40 (от 0,44 до 4,54)
Лимфоциты, % от лейкоцитов	32,6	1,00 (от 0,31 до 3,22)
Th1, тыс./мл	182,4	1,40 (от 0,45 до 4,31)
Th17, тыс./мл	11,4	2,67 (от 0,84 до 8,46)
T _{рег} , % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	4,3	0,49 (от 0,16 до 1,47)
T _{акт} , % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	37,5	0,82 (от 0,27 до 2,42)
Т-лимфоциты CD4 ⁺ , % от лимфоцитов	38,0	1,18 (от 0,42 до 3,36)
Tx-17, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	1,23	1,62 (от 0,56 до 4,75)
Th1, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	20,0	0,43 (от 0,14 до 1,29)
Th1/T _{рег}	4,15	1,01 (0,48 до 2,14)
T _{рег} /Th17	3,57	0,71 (от 0,37 до 1,35)
Т-лимфоциты, продуцирующие ИЛ-10, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	3,63	0,36 (от 0,12 до 1,07)

Примечание. ОШ рассчитано в подгруппах с концентрацией больше или равной медиане по сравнению с меньшим значением медианы в обследованной когорте больных. Отрицательный исход — наличие прогрессирующего и множественного поражения КА (3-я и 4-я группа), положительный — с малоизмененные КА (1-я группа).

Таблица 4. Связь тяжелого и прогрессирующего атеросклероза с наличием у пациентов повышенной концентрации Лп(а), на фоне различных уровней клеточных показателей иммунитета

Показатель	Медиана	ОШ (95% ДИ)
Лп(а), мг/дл	≥11,8	2,76 (от 0,92 до 8,31)
Лейкоциты, 10 ⁶ /мл	≥7,2	9,1 (от 0,86 до 97,3)
Лимфоциты, % от лейкоцитов	≥32,6	2,78 (от 0,53 до 14,50)
Th1, тыс./мл	≥182,4	4,00 (от 0,68 до 23,5)
Th17, тыс./мл	≥11,4	10,00 (от 1,03 до 97,05) [#]
T _{рег} , % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺ *	<4,3	6,50 (от 1,60 до 26,38) [#]
T _{акт} , % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺ *	<37,5	4,69 (от 0,74 до 29,84)
CD4 ⁺ , % от лимфоцитов	≥38,0	4,44 (от 0,80 до 24,61)
Th17, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺	≥1,23	4,44 (от 0,71 до 27,76)
Th1, % от Т-лимфоцитов CD4 ⁺ *	<20,0	4,41 (от 0,91 до 21,30)
Th1/T _{рег}	≥4,15	1,64 (от 0,79 до 3,40)
T _{рег} /Th17*	<3,57	1,93 (от 0,90 до 3,82)
Содержание Т-лимфоцитов, ИЛ-10 продуцирующих, % от CD4 ⁺ Т-лимфоцитов*	<3,63	6,38 (от 1,42 до 28,60) [#]

Примечание. ОШ рассчитано в подгруппах с концентрацией больше или равно по сравнению с меньшим значением медианы в обследованной когорте больных для больных с тяжелым и множественным поражением КА относительно пациентов с малоизмененными КА. * — для показателей с тенденцией к антиатерогенному действию (см. табл. 3) анализ проводили в подгруппах с уровнем меньше медианы по сравнению с большим или равным значению медианы. # — $p < 0,05$.

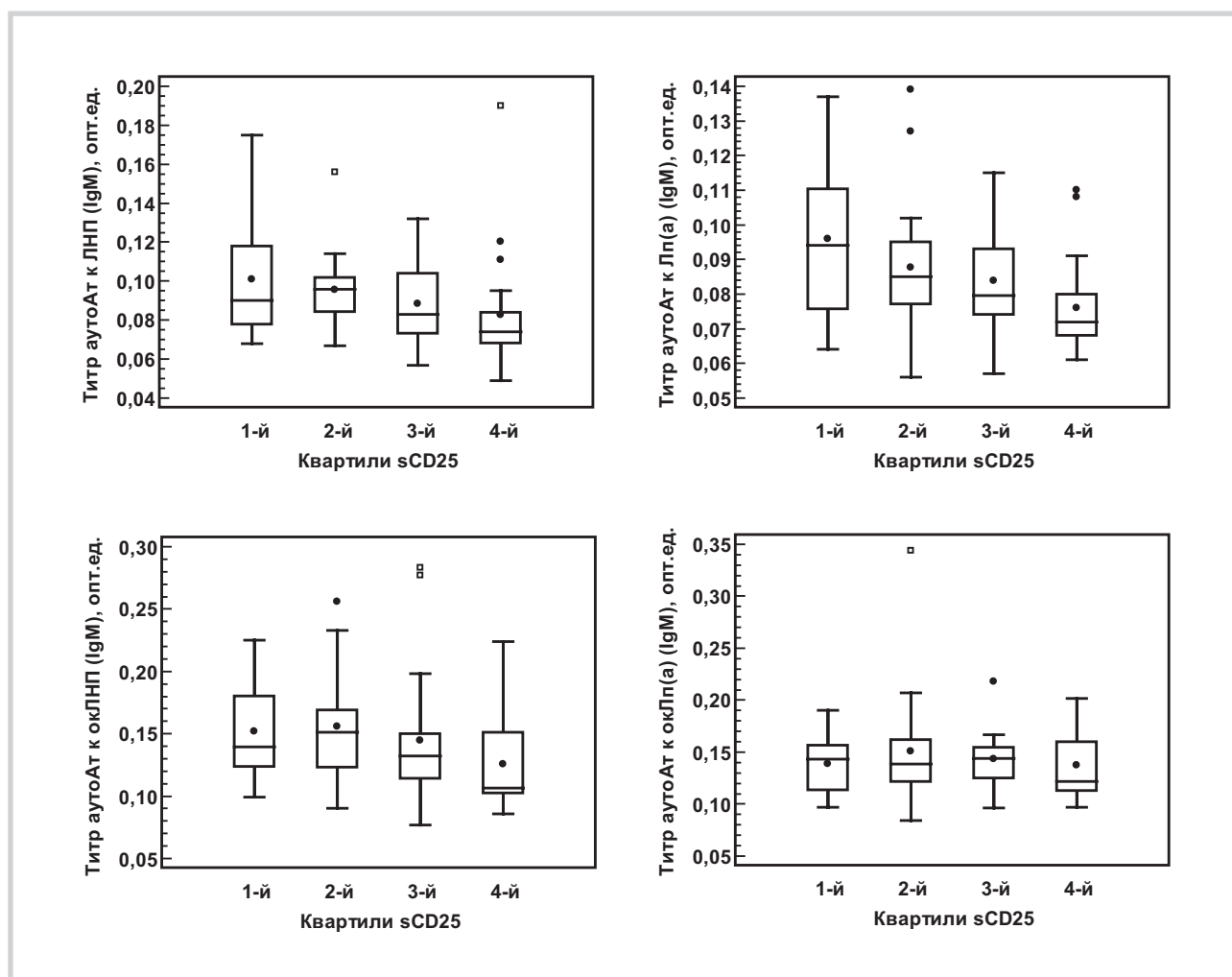


Рис. 2. Взаимосвязь титра аутоАТ к Лп(а) и ЛНП и уровня sCD25 как показателя активации лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

- Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *Am J Pathol.* 2000;157(6):1819-24. doi:10.1016/S0002-9440(10)64820-1
- Laurat E, Poirier B, Tupin E, Caligiuri G, Hansson GK, Bariéty J, Nicoletti A. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2001;104(2):197-202. doi:10.1161/01.CIR.104.2.197
- Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol.* 2010;134(1):33-46. doi:10.1016/j.clim.2009.07.002
- Gao Q, Jiang Y, Ma T, Zhu F, Gao F, Zhang P, et al. A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice. *J Immunol.* 2010;185(10):5820-5827. doi:10.4049/jimmunol.1000116
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133-1141. doi:10.1038/ni1261
- Liuzzo G, Trotta F, Pedicino D. Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: the good, the bad, and the unknown. *Eur Heart J.* 2013;34(8):556-559. doi:10.1093/eurheartj/ehs399
- Климов А.Н. Аутоиммунная теория атерогенеза и концепция модифицированных липопротеидов. *Вестник АМН СССР.* 1990;11:30-36.
- Gabriel Virella, Maria F. Lopes-Virella. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2008;200:239-246. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.025
- Carbone F, Nencioni A, Mach F et al. Evidence on the pathogenic role of auto-antibodies in acute cardiovascular diseases. *Thrombos Haemostas.* 2013;109(5):769-975. doi:10.1160/TH12-10-0768

10. Lehtimäki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkilä M, Jaakkola O, Jokela H, Ylä-Herttua S, Luoma JS, Koivula T, Nikkari T. Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(1):23-27.
doi:10.1161/01.ATV.19.1.23
11. Salonen JT, Ylä-Herttua S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssönen K, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992;11;339(8798):883-887.
doi:10.1016/0140-6736(92)90926-t
12. Nordestgaard BG, Chapman MJ et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J.* 2010;31:2844-2853.
doi:10.1093/eurheartj/ehq386
13. Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Int Med.* 2013;273(1):6-30.
doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02592.x.
14. Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ, Skarlatos S. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease: recent advances and future directions. *Clin Chem.* 2003;49(11):1785-1796.
doi:10.1373/clinchem.2003.023689
15. Ежов М.В., Афанасьева О.И., Камбегова А.А., Афанасьева М.И., Трухачева Е.П., Наумов В.Г., Покровский С.Н. Роль факторов риска атеросклероза в развитии ишемической болезни сердца у мужчин молодого возраста. *Терапевтический архив.* 2009;5:50-53.
16. van Dijk RA, Kolodgie F, Ravandi A, et al. Differential expression of oxidation-specific epitopes and apolipoprotein(a) in progressing and ruptured human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *J Lipid Res.* 2012;53(12):2773-2790.
doi:10.1194/jlr.P030890
17. Baldo G, Giunco S, Kontothanassis D et al. Different apoprotein(a) isoform proportions in serum and carotid plaque. *Atherosclerosis.* 2007;193(1):177-185.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.06.006
18. Афанасьева О.И., Клесарева Е.А., Левашов П.А., Берестецкая Ю.В., Ежов М.В., Артемьева Н.В., Покровский С.Н. Аутоантитела против липопротеида(а) у больных с ишемической болезнью сердца. *Кардиология.* 2014;54(6):4-8.
19. Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Беневоленская Г.Ф., Покровский С.Н. Иммуноферментный метод определения липопротеида(а). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1995;120(10):398-401.
doi:10.1007/bf02444976
20. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;97(Suppl.):77-89.
21. Hoffmann HJ, Malling TM, Topcu A, Ryder LP, Nielsen KR, Varming K, Dahl R, Omland O, Sigsgaard T. CD4dimCD-25brightTreg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry.* 2007;71(6):371-378.
doi:10.1002/cyto.a.20389
22. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive (T and B Cells) Immunity and Control by Dendritic Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114:1640-1660.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302761
23. Brusko TM, Wasserfall CH, Hulme MA, Cabrera R, Schatz D, Atkinson MA. Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. *PLoS One.* 2009;4(11):e7980.
doi:10.1371/journal.pone.0007980
24. Hoeger PH, Niggemann B, Ganschow R, Dammann C, Haeuser G. Serum levels of sCD23 and sCD25 in children with asthma and in healthy controls. *Allergy.* 1994;49(4):217-221.
doi:10.1111/j.1398-9995.1994.tb02652.x
25. Kyaw T, Tipping P, Bobik A, Toh BH. Protective role of natural IgM-producing B1a cells in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2012;22:48-53.
doi:10.1016/j.tcm.2012.06.011
26. Kyaw T-, Tay C, Khan A, Dumouchel V, Cao A, To K, Kehry M, Dunn R, Agrotis A, Tipping P, Bobik A, Toh BH. Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *J Immunol.* 2010;185(7):4410-4419.
doi:10.4049/jimmunol.1000033
27. Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B Cells and Humoral Immunity in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(11):1743-1756.
doi:10.1161/circresaha.113.301145

Поступила 05.08.2015