

ДИСБАЛАНС СУБПОПУЛЯЦИЙ НК-КЛЕТОК И ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Тугуз А.Р.¹, Шумилов Д.С.¹, Муженя Д.В.², Лысенков С.П.²,
Смольков И.В.¹, Татаркова Е.А.¹, Хацац Д.З.³, Ашканова Т.М.³

¹ ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

² ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

³ ГБУЗ РА «Адыгейская республиканская клиническая больница», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Резюме. Экспериментальные исследования патогенетических механизмов развития и течения атеросклероза с участием медиаторов иммунной системы, субпопуляций натуральных киллерных клеток направлены на выявление новых маркеров донозологической диагностики атеросклероза, прогноза течения и мишеней для эффективной таргетной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Цель — исследовать роль медиаторов острого и хронического воспаления IL-17A, IL-1β, TNFα и IL-4, соотношение CD56^{hi}CD16⁻/CD56^{lo}CD16⁺ субпопуляций, натуральных киллеров в патогенезе коронарного атеросклероза с исходом в ишемическую болезнь сердца.

В работе использован комплексный подход, включающий иммунологические, молекулярно-генетические методы: выделение, культивирование мононуклеарных клеток периферической крови, постановку *in vitro* спонтанной и индуцированной продукции медиаторов иммунной системы, иммуноферментный анализ, цитотоксический тест, полимеразная цепная реакция, проточная цитометрия с моноклональными антителами (Beckman Coulter, США) к CD16, CD56 маркерам НК. Контингент обследованных лиц. В исследование включено 130 жителей Северного Кавказа, в том числе больные (n = 62) — пациенты кардиологического отделения Адыгейской республиканской клинической больницы с верифицированным диагнозом ишемической болезни сердца (ИБС) и контрольная группа (n = 68), представленная неродственными здоровыми донорами.

Экспериментально установлено, что носительство 511C аллели гена IL-1β (p < 0,0004; OR = 4,67), A197A генотипа гена IL-17A (p < 0,04; OR = 3,88), G308 SNP гена TNFα (p < 0,01; OR = 3,41) и 589T варианта IL-4 (p < 0,04; OR = 2,45) ассоциировано с гиперпродукцией медиаторов воспаления первой волны, повышающих риск развития ишемической болезни сердца. При атеросклерозе отмечено достоверное снижение спонтанной и индуцированной активности натуральных киллеров (НК), утилизирующих «пенистые клетки» — один из морфологических признаков атерогенеза. НК-активность мононуклеарных клеток периферической крови у больных ИБС по сравнению с контролем, достоверно снижена. У больных ИБС выявлен дисбаланс фенотипически и функционально различающихся CD56^{hi}CD16⁻/CD56^{lo}CD16⁺ субпопуляций НК с преобладанием CD56^{hi}CD16⁻ фенотипа.

Адрес для переписки:

Шумилов Дмитрий Сергеевич
ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет»
385000, Россия, Республика Адыгея, г. Майкоп,
ул. Первомайская, 208.
Тел.: 8 (918) 420-85-88.
Факс: 8 (8772) 57-02-73.
E-mail: lab_genetic@mail.ru

Address for correspondence:

Shumilov Dmitry S.
Adyghe State University
385000, Russian Federation, Republic of Adygheya, Maikop,
Pervomayskaya str., 208.
Phone: 7 (918) 420-85-88.
Fax: 7 (8772) 57-02-73.
E-mail: lab_genetic@mail.ru

Образец цитирования:

А.Р. Тугуз, Д.С. Шумилов, Д.В. Муженя, С.П. Лысенков, И.В. Смольков, Е.А. Татаркова, Д.З. Хацац, Т.М. Ашканова «Дисбаланс субпопуляций НК-клеток и полиморфизмы генов провоспалительных цитокинов в патогенезе атеросклероза» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 1. С. 135–146. doi: 10.15789/1563-0625-ION-2361
© Тугуз А.Р. и соавт., 2022

For citation:

A.R. Tuguz, D.S. Shumilov, D.V. Muzhenya, S.P. Lysenkov, I.V. Smolkov, E.A. Tatarkova, D.Z. Khatsats, T.M. Ashkanova "Imbalance of NK cell subpopulations and polymorphisms of proinflammatory cytokine genes in the pathogenesis of atherosclerosis", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 1, pp. 135–146. doi: 10.15789/1563-0625-ION-2361
DOI: 10.15789/1563-0625-ION-2361

Иммуновоспалительные механизмы развития коронарного атеросклероза ассоциированы с единичными нуклеотидными заменами — полиморфизмами в промоторных регионах генов медиаторов острого и хронического воспаления *IL-17A* (*G197A*), *IL-1β* (*T511C*), *TNFα* (*G308A*). Генетически детерминированная гиперэкспрессия *IL-17A*, *IL-1β* и *TNFα*, подтвержденная в экспериментах по оценке спонтанной и стимулированной продукции цитокинов у больных ИБС в сочетании со сниженной НК-активностью РВМС вследствие преобладания $CD56^{hi}CD16^{-}$ субпопуляции, характеризующейся высокой продукцией цитокинов, проявляется повышением амплитуды провоспалительного компонента, запускающего и длительно поддерживающего патофизиологические процессы развития атеросклероза.

Ключевые слова: атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, цитокины, натуральные киллеры, цитотоксичность, полиморфизмы генов цитокинов, *IL-17A*, *IL-1β*, *IL-4*, *TNFα*

IMBALANCE OF NK CELL SUBPOPULATIONS AND POLYMORPHISMS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN THE PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS

Tuguz A.R.^a, Shumilov D.S.^a, Muzhenya D.V.^b, Lysenkov S.P.^b, Smolkov I.V.^a, Tatarkova E.A.^a, Khatsats D.Z.^c, Ashkanova T.M.^c

^a Adyghe State University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

^b Maikop State Technological University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

^c Adyghe Republican Clinical Hospital, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Abstract. Understanding the pathogenetic mechanism of development and identifying trigger markers of the disease will significantly increase the efficiency of pre-nosological diagnosis and medical follow-up of patients. In this case, one should take into account the role of mutations in cytokine genes, which affect their biochemical activity and production level. The objective of the study was to investigate the role of mediators of acute and chronic inflammation (*IL-17A*, *IL-1β*, *TNFα* and *IL-4*), the ratio of natural killer cell subpopulations ($CD56^{hi}CD16^{-}/CD56^{lo}CD16^{+}$) in pathogenesis of coronary atherosclerosis resulting into coronary heart disease.

To analyze the results, an integrated approach was used, including molecular genetic methods such as polymerase chain reaction, typing of single-nucleotide substitutions in cytokine genes, isolation and cultivation of peripheral blood mononuclear cells, assessment of spontaneous and *in vitro*-induced production of immune system mediators, enzyme-linked immunosorbent assay, cytotoxic test, flow cytometry with monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA) to *CD16*, *CD56* NK markers.

The study included 130 residents of the North Caucasus, including the patients ($n = 62$) treated at the Cardiology Department of the Adyghe Republican Clinical Hospital (ARCB) with a verified diagnosis of ischemic heart disease (IHD), and a control group ($n = 68$), represented by unrelated healthy donors.

Overexpression of cytokines in IHD patients was associated with distinct single nucleotide substitutions in certain genes. Studying a group of residents from the Republic of Adygeya, the authors experimentally established that harboring the *511C* allele of the *IL-1β* gene ($p < 0.0004$; OR = 4.67), *A197A* of the *IL-17A* gene genotype ($p < 0.04$; OR = 3.88), *G308* SNP of *TNFα* gene ($p < 0.01$; OR = 3.41), and *589T* variant of *IL-4* gene ($p < 0.04$; OR = 2.45) are associated with hyperproduction of the first-wave inflammatory mediators that increase the risk of developing ischemic heart disease. In atherosclerosis and associated cardiovascular diseases, we have noted a significant decrease in spontaneous and induced activity of natural killer cells involved in the utilization of “foamy cells”. The NK activity of peripheral blood mononuclear cell in patients with coronary heart disease is significantly reduced. In the IHD patients, an imbalance of phenotypically and functionally different $CD56^{hi}CD16^{-}/CD56^{lo}CD16^{+}$ NK subpopulations with a predominance of $CD56^{hi}CD16^{-}$ phenotype were revealed. Conclusions: Immuno-inflammatory mechanisms of evolving coronary atherosclerosis are associated with single-nucleotide substitutions, i.e., polymorphisms in the promoter regions of the *IL-17A* (*G197A*), *IL-1β* (*T511C*), and *TNFα* (*G308A*), the known mediators of acute and chronic inflammation.

Genetically determined overexpression of IL-17A, IL-1 β , and TNF α , confirmed in experiments on evaluation of spontaneous and stimulated cytokine production in patients with CHD, together with reduced NK activity of PBMC, due to predominance of CD56^{hi}CD16⁻, a subpopulation with high cytokine production, manifested by an increased pro-inflammatory component that triggers and provides long-term support to pathophysiological processes of atherosclerosis.

Keywords: atherosclerosis, coronary artery disease, cytokines, natural killer cells, cytotoxicity, cytokine gene polymorphisms, IL-17A, IL-1 β , IL-4, TNF α

Введение

Теории атерогенеза, разработанные на протяжении двух веков и дополненные с позиций современных методов, тем не менее, не дают целостного представления о триггерных факторах развития и прогрессирования атеросклероза. Классическая холестериновая, иммунно-воспалительная, биохимическая и современная сульфатная теории атерогенеза связывают пусковые патогенетические механизмы с биохимическими и морфологическими маркерами эндотелиальной дисфункции, вызванной повышением уровня глюкозы, молекул адгезии, образованием холестериновых бляшек, изменением гемодинамики в сосудах разного калибра, дисбалансом сульфат-анионов и т.д. Генетическая теория акцентирует внимание на ведущей роли «генов-кандидатов», запускающих и длительно поддерживающих прогрессивное течение атеросклероза, но не всегда достоверно ассоциированных с риском развития кардиоваскулярной патологии: ИБС, ишемического инсульта мозга (ИИМ) и др. нозологий. При отсутствии единых представлений о триггерных механизмах развития, тем не менее, все теории атерогенеза признают неоспоримые морфологические признаки — образование пенистых клеток и отложение кристаллов холестерина в интиму сосуда. Поэтому, согласно утверждениям одного из последних отчетов ВОЗ (2 июня 2018), холестерин «является ключевым компонентом в развитии атеросклероза» и в сочетании с показателями уровней липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), используется в качестве основного маркера повышенного риска развития и прогноза течения ССЗ практически во всех странах [7, 10, 12, 14, 15, 17].

Однако вопреки широко распространенному мнению, международная группа врачей (17 кардиологов из США, Швеции, Великобритании, Италии, Ирландии, Франции, Японии и других стран) по результатам обработки данных 1,3 миллиона пациентов (обзор опубликован в Expert Review of Clinical Pharmacology), опровергает полувековое утверждение об облигатной роли холестерина, ЛПНП (так называемого, «плохого холестерина») в атерогенезе и ССЗ [14].

Поэтому новый подход к пересмотру теории атерогенеза и ассоциированных с ним ССЗ предполагает акцентировать внимание на участии иммунной системы, имеющей по мнению Р. Вирхова «немаловажное значение в организме». Однако триггерная роль медиаторов иммунной системы — цитокинов (интерлейкинов) и их рецепторов в патогенетических механизмах повреждения эндотелия сосудов, поддержании каскада необратимых и прогрессивных процессах формирования атеросклеротических бляшек, не установлена. Во многом это обусловлено тем, что открытые в 60-80 годах XX века медиаторы воспаления в системном кровотоке не детектируются, так как транзиторная гиперцитокинемия регулируется ускоренным (в течении нескольких минут: T1/2 быстрый компонент IL-1 β составляет всего 1,9 мин) и медленным клиренсом (T1/2 медленный компонент реализуется через 30-120 мин). Это подтверждает данные о том, что не только свободные, но и нековалентно связанные с мембранами клеток, растворимыми рецепторами-ловушками цитокины персистируют в системном кровотоке. Высвобождение медиаторов из комплексов может обуславливать локальную гиперцитокинемию и запускать внутриклеточные сигнальные пути с последующей вазоконстрикцией, активацией генов, вызывающих повреждение эндотелия сосудов, повышение экспрессии молекул адгезии, трансформацию миоцитов, моноцитов/макрофагов в пенистые клетки, инициировать процессы атеросклеротического повреждения сосудов [7, 9, 18].

Консолидация иммуновоспалительной, генетической и других теорий атерогенеза может быть основана на детерминированной гиперэкспрессии генов цитокинов, обусловленной SNP промоторных регионов, влияющих на уровни продукции, биохимической активности медиаторов иммунной системы, экспрессии молекул адгезии, превращении моноцитов/макрофагов и гладкомышечных клеток в пенистые клетки с последующим отложением кристаллов холестерина в интиму сосудов [2].

Известно, что медиаторы иммунной системы — провоспалительные цитокины активируют

синтез липидов и влияют на перераспределение холестерина в цитоплазматической мембране и внутри клетки. Стимулирующий дозозависимый эффект цитокинов на синтез этерифицированного холестерина (ЭХС) и триглицеридов (ТГ) в макрофагах (МФ) наблюдается после 24 ч преинкубации клеток с рекомбинантными $TNF\alpha$ и $IL-1\beta$ [2].

Поэтому представляется целесообразным проанализировать иммуногенетические механизмы развития, прогрессирования атеросклероза и ассоциированных с ним ССЗ с участием медиаторов острого и хронического воспаления «первой волны» $IL-17A$, $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ и NK .

Цель работы — исследовать роль медиаторов острого и хронического воспаления $IL-17A$, $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ и $IL-4$, соотношение $CD56^{hi}CD16^{-}/CD56^{lo}CD16^{+}$ субпопуляций, натуральных киллеров в патогенезе коронарного атеросклероза с исходом в ишемическую болезнь сердца.

Материалы и методы

В исследование включено 130 жителей Республики Адыгея. Больные ИБС ($n = 62$) — пациенты кардиологического отделения Адыгейской республиканской клинической больницы. Диагнозы ИБС установлены с учетом характерных для данной категории лиц жалоб, анамнестических данных, биохимических и инструментальных методов обследования (электрокардиографии (ЭКГ); холтеровского мониторирования ЭКГ; нагрузочных проб: тредмил-тест и велоэргометрия; эхокардиоскопия (ЭХО КС)), в соответствии с национальными рекомендациями по диагностике и лечению ИБС. Стабильная стенокардия подтверждена результатами коронарной ангиографии (КАГ). Критерии диагностики ИБС — данные холтеровского мониторирования ЭКГ и нагрузочных проб: депрессия, элевация сегмента ST в двух или более смежных отведениях, инверсия зубца T, появление патологических зубцов Q. По ЭХО КС — наличие зон гипокинеза, дисфункция папиллярных мышц, клапанов, наличие аневризм, нарушение систолической функции за счет зон локального гипокинеза миокарда. КАГ — наличие обструктивного поражения коронарных артерий в виде атеросклеротических бляшек, стенозирующих, либо окклюзирующих просвет коронарных артерий.

Основания исключения пациентов из исследования: острые воспалительные заболевания, обострение хронических воспалительных заболеваний, активные заболевания печени, почечная недостаточность, онкологические заболевания. У больных диагностированы — стабильная стено-

кардия напряжения: II, III и IV функциональных классов (ФК); хроническая сердечная недостаточность (ХСН): I, II, III и IV ФК.

Группа контроля представлена неродственными здоровыми донорами ($n = 68$), проживающими в Республике Адыгея, без наследственной отягощенности и клинических проявлений ССЗ, что подтверждено данными опроса (анкетирование), осмотра и обследования в условиях лечебно-профилактических учреждений Республики Адыгея.

В соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266, все исследования проведены с информированного согласия больных и доноров или законных представителей.

Геномная ДНК выделена из цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ «Литех», Россия). Чистота образцов и концентрация ДНК (2 нг/мл) тестированы на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Termo Scientific, США). Полиморфизмы генов $IL-17A$ ($G197A$), $IL-1\beta$ ($C511T$), $IL-4$ ($C589T$) и $TNF\alpha$ ($G308A$) в образцах ДНК доноров и больных типированы ПЦР с использованием коммерческих тест-систем НПФ «Литех» (Россия) и электрофоретической детекцией результатов.

Выделение РВМС

Мононуклеарные клетки периферической крови (peripheral blood mononuclear cells — РВМС) выделены из стабилизированной гепарином (25 ед/мл) венозной крови на одноступенчатом градиенте фиколла (Histopaque, плотность 1,077, «ПанЭко», Москва) центрифугированием при 4 °C и 400 g в течение 30 минут. Лимфоидные клетки, образовавшие интерфазное кольцо, собраны пипеткой в пробирки и трехкратно отмыты в 10-кратном объеме среды RPMI (Gibco, США). После каждой отмытки клетки осаждены центрифугированием при 1000 об/мин и 4 °C, ресуспендированы в 1 мл среды, разведены рабочей культуральной средой (РКС) до концентрации $2-5 \times 10^6$ клеток/мл. Подсчет РВМС произведен в 25 больших квадратах камеры Горяева по формуле:

$$N = a \times 50 \times 100,$$

где: N — общее количество РВМС в 1 мл среды, а — количество РВМС в 25 больших квадратах камеры Горяева.

Средние уровни цитокинов в анализируемых триплетах определены в твердофазном сэндвич-ИФА с использованием коммерческих

тест-систем (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург, ООО «Протеиновый контур», Россия) на мульти-модальном ридере CLARIOstar Plus (Германия) при длине волны 450 нм.

Постановка спонтанной и стимулированной продукции цитокинов

При исследовании спонтанной и стимулированной продукции цитокинов, интактные РВМС в концентрации $2-5 \times 10^6$ кл/мл в полной культуральной среде RPMI-1640 (с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крови телят, 80 мкг/мл гентамицина), инкубированы в 24-луночных плоскодонных планшетах в течение 18 часов в CO_2 — инкубаторе («Сапуо», Япония) при 37°C и 5% CO_2 и в присутствии 5 мкг/мл ФГА («ПанЭко», Москва).

Цитотоксический тест. В 96-луночные плоскодонные планшеты (Flow Laboratories) внесли по 100 мкл суспензии РВМС в концентрации от 5×10^5 до 2×10^6 на 1 мл рабочей культуральной среде (РКС) и по 100 мкл суспензии клеток-мишеней (К-562) с концентрацией от $2,5 \times 10^4$ до 4×10^5 на 1 мл РКС. Соотношения эффекторов (РВМС) и клеток-мишеней (К-562) составляли 20:1; 10:1; 5:1; 2,5:1; 1:1. В контрольных лунках, содержащих только эффекторы или мишени в 100 мкл РКС добавлено по 100 мкл культуральной среды. Варианты исследований тестированы в триплетах. Через 18-24 часов инкубации в атмосфере 5% CO_2 и 100 % влажности при 37°C , во все лунки планшеты добавлено по 20 мкл рабочего раствора МТТ (тетразолиевый краситель, «ПанЭко») в концентрации 5 мг/мл. После 3-4 часовой инкубации в CO_2 -инкубаторе при тех же условиях, планшеты отцентрифугированы при 1500 об/мин (5 мин), супернатант удален и в каждую лунку добавлено по 150 мкл DMSO (диметилсульфоксид, «ПанЭко»). Через 30 мин инкубации при 25°C , после полного растворения кристаллов формазана измерена оптическая плотность (ОП) содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре (Microplate Reader, BioRad, США) при длине волны 540 нм. Цитотоксичность выражена цитотоксическим индексом (ЦИ) в процентах:

$$\text{ЦИ}(\%) = \left(\frac{1 - (\text{ОПэ} + \text{м} - \text{ОПэ})}{\text{ОПм}} \right) - 100,$$

где: ОПэ+м — значение оптической плотности в опытных сериях; ОПэ — оптическая плотность в лунках с эффекторами; ОПм — оптическая плотность в лунках с мишенями.

Типирование субпопуляций NK

Иммунофенотипирование субпопуляций NK проводили с использованием метода проточной

цитометрии на цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) с моноклональными антителами к CD16, CD56 (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка данных

Распределение частот генотипов по исследованным полиморфным локусам генов проверены на соответствие равновесию Харди—Вайнберга с помощью критерия χ^2 (хи — квадрат). Описательная статистика групп представлена в формате: значения медианы (Me), 25-го и 75-го квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Частота генотипа и аллеля определена долей, отнесенной к общему количеству генотипов (или аллелей) в исследуемой группе и выражены в долях единицы. Достоверность различий концентраций цитокинов в образцах сывороток, культуральной среде РВМС доноров и больных определены с использованием пакета программ SPSS Statistics 17.0, параметрического критерия Стьюдента (t) при $p \leq 0,05$.

Результаты

Для экспериментального подтверждения участия медиаторов воспаления в атерогенезе проанализированы уровни цитокинов в образцах сывороток, супернатантов интактных и стимулированных *in vitro* ФГА РВМС больных ИБС (табл. 1).

Несмотря на утверждения о прогностической значимости сывороточных концентраций цитокинов, тестируемых в узком диапазоне значений (0-50 пг/мл), в 75% образцах сывороток обследованных больных ИБС и здоровых жителей РА, про- и противовоспалительные цитокины IL-17A, IL-1 β , TNF α и IL-4 не детектируются (Me = 0), у 25% обнаруживаются в следовых количествах (2-10 пг/мл), не превышающих нижней границы чувствительности метода (табл. 1).

Более информативные уровни спонтанной продукции IL-17A, IL-1 β , TNF α у больных с ИБС получены при сравнительном анализе концентраций медиаторов воспаления в супернатантах интактных РВМС больных и доноров: IL-17A (соответственно $65,85 \pm 15,89$ пг/мл и $7,95 \pm 5,24$ пг/мл; $t = 3,46$, $p < 0,01$); IL-1 β ($65,0 \pm 22,19$ пг/мл и $10,88 \pm 3,86$ пг/мл; $t = 2,40$; $p < 0,01$); TNF α — ($435,63 \pm 77,14$ пг/мл и $31,56 \pm 13,71$ пг/мл; $t = 5,16$; $p < 0,01$).

При стимуляции *in vitro* ФГА РВМС больных продуцируют статистически значимо также более высокие концентрации IL-17A (соответственно, $107,8 \pm 8,2$ пг/мл и $84,09 \pm 12,96$ пг/мл; $t = 6,4$; $p_1 = 0,000001$), IL-1 β (соответственно, $91,46 \pm 17,55$ пг/мл и $24,27 \pm 6,85$ пг/мл; $t = 3,57$; $p < 0,01$) и TNF α ($672,22 \pm 30,69$ пг/мл и $406,41 \pm 46,38$ пг/мл; $t = 4,78$; $p < 0,01$) (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. СЫВОРОТОЧНЫЕ УРОВНИ, СПОНТАННАЯ И СТИМУЛИРОВАННАЯ *IN VITRO* ПРОДУКЦИЯ IL-17A, IL-1 β И TNF α В ГРУППАХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС

TABLE 1. SERUM LEVELS, SPONTANEOUS AND STIMULATED *IN VITRO* PRODUCTION OF IL-17A, IL-1 β , AND TNF α IN GROUPS OF DONORS AND SUFFERERS OF CHD

Биологические среды Biological media	Концентрации цитокинов, пг/мл и $n \times 10^{-9}$ мм/мл Cytokine concentrations, pg/ml and $n \times 10^{-9}$ mM/ml						t; p
	Больные Patients			Доноры Donors			
	M±m, пг/мл M±m, pg/ml	Me	$n \times 10^{-9}$ мм/мл $n \times 10^{-9}$ mM/ml	M±m, пг/мл M±m, pg/ml	Me	$n \times 10^{-9}$ мм/мл $n \times 10^{-9}$ mM/ml	
IL-17A	n = 20			n = 32			
Сыворотка Serum	0,91±0,91	0,00	0,03	4,88±2,61	0	0,14	t ₁ = 1,42; p ₁ < 0,05
PBMC	65,85±15,89	85,5	1,88	2,95±1,26	0	0,27	t ₁ = 0,5; p ₁ > 0,05
PBMC + ФГА PBMC + PHA	107,8±8,2	103,5	3,08	84,09±12,96	91	2,4	t ₁ = 6,4; p ₁ = 0,000001
t, p	t ₃ = 4,08; p ₃ = 0,0007 t ₄ = 12,96; p ₄ = 0,0000001			t ₃ = 0,67; p ₃ > 0,05 t ₄ = 5,99; p ₄ = 0,0000001			
IL-1β	n = 20			n = 32			
Сыворотка Serum	1,05±0,48	0,56	0,06	2,3±1,5	0,1	0,13	t ₁ = 0,38; p ₁ < 0,05
PBMC	65,00±22,19	27,31	3,82	11,95±2,87	5,9	0,7	t ₁ = 8,78; p ₁ < 0,000001
PBMC + ФГА PBMC + PHA	91,46±17,55	101	5,38	30,60±4,95	33,84	1,8	t ₁ = 2,68; p ₁ < 0,01
t, p	t ₃ = 2,88; p ₃ = 0,009 t ₄ = 5,15; p ₄ = 0,00004			t ₃ = 2,98; p ₃ = 0,004 t ₄ = 5,47; p ₄ = 0,000002			
TNFα	n = 20			n = 32			
Сыворотка Serum	0,10±0,06	0,00	0,0001	6,31±0,70	6,44	0,12	t ₁ = 8,84; p ₁ > 0,0000001
PBMC	435,63±77,14	356,3	8,38	36,71±7,20	24,75	0,7	t ₁ = 5,15; p ₁ = 0,00001
PBMC + ФГА PBMC + PHA	672,22±30,69	698,5	12,93	140,01±36,33	329	6,54	t ₁ = 11,19; p ₁ = 0,000001
t, p	t ₃ = 5,65; p ₃ = 0,00002 t ₄ = 21,9; p ₄ = 0,0000001			t ₃ = 4,2; p ₃ = 0,0001 t ₄ = 3,68; p ₄ = 0,0006			
IL-4	n = 20			n = 32			
Сыворотка Serum	0,00±0,00	0,00	0,00	0,01±0,01	0,00	0,0005	p* > 0,05
PBMC	0,20±0,17	0,00	0,01	0,16±0,12	0,00	0,03	p* > 0,05
PBMC + ФГА PBMC + PHA	0,56±0,24	0,17	0,03	0,16±0,11	0,00	0,03	p* > 0,05
t, p	p _{2, 3, 4} > 0,05			p _{2, 3, 4} > 0,05			

Примечание. М – средняя арифметическая; m – стандартная ошибка среднего; Me – медиана; p – уровень значимости t-критерия Стьюдента между: p₁ – донорами и больными; p₂ – РВМС и сывороткой; p₃ – РВМС + ФГА и сывороткой; p₄ – РВМС и РВМС + ФГА.

Note. M, arithmetic average; m, standard error of the mean; Me, median; p, significance value of Student's t-criterion between: p₁, donors and patients; p₂, PBMC and serum; p₃, PBMC + PHA and serum; p₄, PBMC and PBMC + PHA.

IL-4 у доноров и больных ИБС практически не детектируется ни в одном из исследуемых анализов (образцах сывороток и супернатантов интактных и стимулированных *in vitro* РВМС), что подтверждает избирательное блокирование функциональных и резервных возможностей РВМС продуцировать один из важнейших регуляторных медиаторов иммунной системы. Снижение уровня IL-4 у пациентов с начальными атеросклеротическими изменениями коронарных сосудов также отмечено Дутовой С.В. и соавт. (2018) [18].

Медиаторы хронического (IL-17A), острого (IL-1 β) воспаления, а также основного провоспалительного TNF α и регуляторного IL-4, по мнению ряда авторов, участвуют в повреждении интимы сосудов, трансформации базовой воспалительной реакции, развитии и прогрессивном течении атеросклероза [1, 5, 11, 13, 16]. Ассоциация типированных полиморфизмов промоторных регионов генов *IL-17A* (*G197A*, rs2275913), *IL-1 β* (*T511C*, rs16944), *TNF α* (*G308A*, rs1800629) и *IL-4* (*C589T*, rs2243250) с гиперпродукцией цитокинов подтверждена данными, представленными в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ, *G197A*, *T511C*, *G308A*, *C589T*, SNP ГЕНОВ *IL-17A*, *IL-1 β* , *TNF α* И *IL-4* В ГРУППАХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС

TABLE 2. DISTRIBUTION OF *G197A*, *T511C*, *G308A*, *C589T*, SNP GENES *IL-17A*, *IL-1 β* , *TNF α* AND *IL-4* IN GROUPS OF DONORS AND IHD PATIENTS

Ген, SNP Gene, SNP	Больные Patients	Доноры Donors	P	OR (95% CI)	
				Знач. Value	95% CI
<i>IL-17A</i>	n = 62	n = 68			
<i>G197G</i>	0,259	0,526	0,04*	0,32	0,11-0,92
<i>G197A</i>	0,370	0,342		1,13	0,40-3,17
<i>A197A</i>	0,370	0,132		3,88	1,14-13,19
<i>G197</i>	0,444	0,697	0,004*	0,35	0,17-0,72
<i>197A</i>	0,556	0,303		2,88	1,39-5,96
<i>IL-1β</i>	n = 62	n = 68			
<i>T511T</i>	0,269	0,774	0,0007*	0,11	0,03-0,36
<i>T511C</i>	0,577	0,161		7,09	2,07-24,34
<i>C511C</i>	0,154	0,065		2,64	0,44-15,72
<i>T511</i>	0,558	0,855	0,0004*	0,21	0,09-0,52
<i>511C</i>	0,442	0,145		4,67	1,91-11,42
<i>TNFα</i>	n = 62	n = 68			
<i>G308G</i>	0,696	0,400	0,05*	3,43	1,04-11,33
<i>G308A</i>	0,304	0,440		0,56	0,17-1,83
<i>A308A</i>	0,000	0,160		0,10	0,01-2,00
<i>G308</i>	0,848	0,620	0,01*	3,41	1,27-9,16
<i>308A</i>	0,152	0,380		0,29	0,11-0,79
<i>IL-4</i>	n = 62	n = 68			
<i>C589C</i>	0,308	0,645	0,04*	0,24	0,08-0,74
<i>C589T</i>	0,692	0,355		4,09	1,35-12,43
<i>T589T</i>	0,000	0,000		1,19	0,02-61,98
<i>C589</i>	0,654	0,823	0,04*	0,41	0,17-0,97
<i>589T</i>	0,346	0,177		2,45	1,03-5,84

Примечание. n – количество обследованных; p – уровень значимости; OR – отношение шансов; CI – доверительный интервал; * – статистически значимые различия по χ^2 ($p \leq 0,05$).

Note. n, number of people under study; p, significance value; OR, odds ratio; CI, confidence interval; *, statistically significant difference according to χ^2 ($p \leq 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ ПРОДУКЦИИ IL-17A, IL-1 β И TNF α ИНТАКТНЫМИ И СТИМУЛИРОВАННЫМИ *IN VITRO* ФГА РВМС ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА

TABLE 3. PRODUCTION LEVELS OF IL-17A, IL-1 β AND TNF α BY INTACT AND *IN VITRO* STIMULATED PHA PBMC AND NE DONORS AND IHD PATIENTS DEPENDING ON GENOTYPE

Биологические среды Biological media	Группы Groups	Концентрации, пг/мл Concentration, pg/ml			t ₁	t ₂	t ₃
		M±m, пг/мл M±m, pg/ml	M±m, пг/мл M±m, pg/ml	M±m, пг/мл M±m, pg/ml			
IL-17A		GG	GA	AA			
Сыворотка крови Blood serum	больные [‡] patients	0,00	0,91±0,91	0,00	a, b, c – p > 0,05	a – p > 0,05	d, e – p > 0,05
	доноры [#] donors	0,00	15,35±8,76	–			
PBMC	больные [‡] patients	16,38±4,10	86,63±1,46	101±1	a, b, c – p < 0,05*	a – p < 0,05*	d, e – p < 0,05*
	доноры [#] donors	0,00	7,95±5,24	–			
PBMC + ФГА PBMC + PHA	больные [‡] patients	103,50±12,33	100,13±7,03	141,85±1,85	a, b, c – p < 0,05*	a – p < 0,05*	d, e – p < 0,05*
	доноры [#] donors	0,00	73,90±21,17	–			
Коэффициент корреляции для AA генотипа: r = 0,8-0,9, p = 0,01-0,05 Correlation coefficient for AA genotype: r = 0.8-0.9, p = 0.01-0.05							
IL-1β		TT	TC	CC			
Сыворотка крови Blood serum	больные [‡] patients	0,74±0,04	1,93±0,71	0,02±0,02	a, b, c – p > 0,05	a, b, c – p > 0,05	d, e, f – p > 0,05
	доноры [#] donors	0,06±0,07	0,09±0,07	0,00			
PBMC	больные [‡] patients	27,15±0,15	116,50±13,15	59,18±12,94	a, b, c – p < 0,05*	a, b, c – p < 0,05*	d, e, f – p < 0,05*
	доноры [#] donors	2,61±1,01	19,88±6,23	0,41±0,34			
PBMC + ФГА PBMC + PHA	больные [‡] patients	100,5±0,5	104,98±21,40	59,66±11,35	a, b, c – p < 0,05*	a, b, c – p < 0,05*	d, e, f – p < 0,05*
	доноры [#] donors	13,99±10,62	34,57±12,01	24,26±8,38			
Коэффициент корреляции для TC генотипа: r = 0,86-0,9, p = 0,01-0,05 Correlation coefficient for TC genotype: r = 0.86-0.9, p = 0.01-0.05							
TNFα		GG	GA	AA			
Сыворотка крови Blood serum	больные [‡] patients	0,15±0,10	1,62±0,63	0,00±0,00	a, b, c – p > 0,05	a, b, c – p > 0,05	d, e, f – p > 0,05
	доноры [#] donors	1,68±2,38	1,37±1,06	0,00±0,00			
PBMC	больные [‡] patients	436,86±82,20	194,13±1,24	0,00±0,00	a, b, c – p < 0,05*	a, b, c – p < 0,05*	d, e, f – p < 0,01*
	доноры [#] donors	8,12±5,51	2,35±1,92	6,87±5,61			
PBMC + ФГА PBMC + PHA	больные [‡] patients	613,52±76,60	149,5±0,5	0,00±0,00	a, b, c – p < 0,05*	a, b, c – p < 0,05*	d, e, f – p < 0,01*
	доноры [#] donors	615,00±1,41	145,75±15,00	171,52±11,00			
Коэффициент корреляции для GG генотипа: r = 0,88-0,90, p = 0,01-0,05 Correlation coefficient for GG genotype: r = 0.88-0.90, p = 0.01-0.05							

Примечание. [†] – n = 20; [#] – n = 32; M – средняя арифметическая; m – стандартная ошибка среднего; * p \leq 0,05; t – критерий Стьюдента; t₁ – сравнение генотипов больных: (IL-17A и TNF α) a1 – GG/GA, b2 – GG/AA, c3 – GA/AA, (IL-1 β) a1 – TT/TC, b2 – TT/CC, c3 – TA/CC; t₂ – сравнение генотипов доноров: a1 (IL-1 β) – TT/TA, b2 – TT/AA, c3 – TA/AA; r – интервал коэффициента корреляции между генотипами AA (IL-17A), TC (IL-1 β), GG (TNF α) и продукцией РВМС, РВМС + ФГА.

Note. [†], n = 20; [#], n = 32; M, arithmetic average; m, standard error of the mean; * p \leq 0.05; p, Student's t-criterion; t₁, comparison of patients' genotypes: (IL-17A and TNF α) a1 – GG/GA, b2 – GG/AA, c3 – GA/AA, (IL-1 β) a1 – TT/TC, b2 – TT/CC, c3 – TA/CC; t₂, comparison of donors' genotypes: a1 (IL-1 β) – TT/TA, b2 – TT/AA, c3 – TA/AA; r, correlation coefficient interval between genotypes AA (IL-17A), TC (IL-1 β), GG (TNF α) and production of PBMC, PBMC + PHA.

ТАБЛИЦА 4. СПОНТАННАЯ И СТИМУЛИРОВАННАЯ НК-АКТИВНОСТЬ РВМС В НОРМЕ И ПРИ ИБС

TABLE 4. SPONTANEOUS AND STIMULATED NK ACTIVITY OF PMBC AND NE IN THE NORMAL CONDITION AND IN CASE OF IHD

Соотношение Км/Кэф* Km/Keff Ratio	Цитотоксический индекс (%) Cytotoxic efficiency (%)		
	Больные РВМС Patients PBMC (n = 15)	Доноры РВМС Donors PBMC (n = 19)	t-критерий Стьюдента; p t-Student's criterion; p
	M±m	M±m	
СП (1:1) SP (1:1)	31,06±2,99	41,60±2,68	t = 2,62; p = 0,01
СТ ФГА (1:1) ST PHA (1:1)	40,27±2,97	48,21±5,57	t = 1,26; p = 0,2
СП (1:5) SP (1:5)	36,41±3,04	57,30±5,87	t = 3,16; p = 0,003
СТ ФГА (1:5) ST PHA (1:5)	61,65±2,84	64,35±4,28	t = 0,53; p = 0,6
СП (1:10) SP (1:10)	29,61±4,77	55,57±5,26	t = 3,66; p = 0,0009
СТ ФГА (1:10) ST PHA (1:10)	71,89±4,47	62,28±4,58	t = 1,50; p = 0,14

Примечание. СП – спонтанная НК-активность; СТ – стимулированная ФГА НК-активность; М – средняя арифметическая; m – стандартная ошибка среднего; * – соотношение клеток мишеней к клеткам эффекторам.

Note. SP, spontaneous NK activity; ST, stimulated PHA NK activity; M, arithmetic average; m, standard error of the mean.

В рамках экспериментального исследования установлено, что у носителей 511C аллели гена *IL-1β* ($p < 0,0004$; OR = 4,67), A197A генотипа гена *IL-17A* ($p < 0,04$; OR = 3,88), G308 SNP гена *TNFα* ($p < 0,01$; OR = 3,41) и 589T варианта *IL-4* ($p < 0,04$; OR = 2,45) риск развития ИБС достоверно повышен (табл. 2). Участие SNP генов про- и противовоспалительных цитокинов *IL-17A* (G197A), *IL-1β* (T511C), *TNFα* (G308A) и *IL-4* (C589T) в развитии ИБС, может быть подтверждено анализом уровней спонтанной и стимулированной *in vitro* продукции атерогенных медиаторов острого и хронического воспаления.

На основании полученных данных (табл. 2) о влиянии однонуклеотидных замен в промоторных регионах генов на функциональную активность РВМС доноров и больных установлено, что мутантный A197A генотип гена *IL-17A* коррелирует ($r = 0,8-0,9$; $p = 0,01-0,05$) с более высокой продукцией медиатора. Аналогичные зависимости выявлены и для других медиаторов воспаления «первой волны» *IL-1β* и *TNFα*. Высокие уровни спонтанной и стимулированной продукции провоспалительного *IL-1β* в группе больных ИБС коррелируют с носительством T511C

гетерозиготного генотипа ($r = 0,86-0,9$; $p = 0,01-0,05$), а *TNFα* – с G308G «диким» гомозиготным вариантом ($r = 0,88-0,9$; $p = 0,01-0,05$) (табл. 3).

Атерогенные эффекты РВМС проявляются не только гиперпродукцией цитокинов, но и снижением их НК-активности. Дисбаланс функций эффекторных клеток иммунной системы длительно поддерживает хроническое воспаление в интима сосудов [3, 6, 8]. Участие НК в повреждении эндотелия коронарных и периферических сосудов предопределило исследование *in vitro* НК-активности РВМС в норме и при ИБС.

НК-активность РВМС у больных ИБС по сравнению с контролем достоверно снижена, что в определенной степени подтверждает их участие в атерогенезе (табл. 4). На основании экспериментальных данных можно утверждать, что при прогрессирующем атеросклерозе коронарных сосудов, спонтанная и индуцированная НК-активность РВМС у больных ИБС достоверно ниже ($p < 0,01$), чем у доноров. Механизм супрессии функциональной НК-активности РВМС не установлен, но выдвигаются предположения об усилении апоптоза натуральных киллерных клеток у больных ССЗ [3, 6, 8].

ТАБЛИЦА 5. СООТНОШЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ НК У БОЛЬНЫХ ИБС И ДОНОРОВ

TABLE 5. RATIO OF NK SUBPOPULATIONS IN IHD PATIENTS AND DONORS

Субпопуляции НК NK subpopulations	Больные Patients (n = 25)	Доноры Donors (n = 15)	t, p
	M±m (%)	M±m (%)	
CD56 ^{hi} CD16 ⁻	3,48±0,43	0,87±0,20	t = 5,5; p = 0,000008
CD56 ^{lo} CD16 ⁺	0,78±0,14	0,51±0,30	t = 0,82; p = 0,42
CD56 ^{hi} CD16 ⁺	8,44±2,54	9,48±0,97	t = 1,07; p = 0,29

Примечание. М – средняя арифметическая; m – стандартная ошибка среднего; p – уровень значимости; t – критерий Стьюдента; % – процентное содержание от всех лимфоцитов.

Note. M, arithmetic mean; m, standard error of the mean; p, level of significance; t, Student's test; %, percentage of all lymphocytes.

Низкая НК-активность РВМС больных ССЗ подтверждена в пилотных исследованиях методом проточной цитометрии при анализе соотношения двух субпопуляций натуральных киллеров CD56^{hi}CD16⁻/CD56^{lo}CD16⁺, различающихся как уровнем продукции медиаторов, так и цитотоксической активностью (табл. 5) [3, 6, 8].

Обсуждение

Атеросклеротические поражения коронарных, цереброваскулярных и периферических сосудов приводят к развитию сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), от которых ежегодно умирает более 17,5 млн человек. Это самый высокий показатель смертности населения в мире. В связи с этим в XXI в. ВОЗ выбрала приоритетным направлением разработку стратегий по снижению заболеваемости и смертности населения от ССЗ путем эффективной первичной профилактики атеросклероза и других медицинских инноваций регуляцией уровня холестерина и на глобальном уровне.

Однако методы профилактики, лечения, прогнозирования течения атеросклероза и ассоциированных с ним ССЗ, основанные на антихолестериновой терапии, на протяжении многих десятилетий не приводят к их заметному снижению, более того имеют выраженную тенденцию к неуклонному росту заболеваемости и смертности населения многих стран.

Новый концептуальный подход к пересмотру теорий атерогенеза предполагает акцентировать внимание на ведущей роли иммунной системы с участием медиаторов острого и хронического воспаления, запускающих и длительно поддерживающих патогенетические механизмы в интимае сосудов [7]. Экспериментальными исследованиями

последних лет подтверждено непосредственное участие цитокинов в нарушении проницаемости сосудов, трансформации макрофагов в пенистые клетки и нарушении их утилизации [1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 16, 18], однако при этом не удается обнаружить высокие сывороточные концентрации цитокинов при острых и хронических сосудистых нарушениях [1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 16, 18]. Таким образом триггерная роль медиаторов иммунной системы – цитокинов и их рецепторов в патогенетических механизмах повреждения эндотелия сосудов, поддержании каскада необратимых и прогрессирующих процессов формирования атеросклеротических бляшек до настоящего времени не установлена. Но учитывая то, что подобно другим сигнальным молекулам, цитокины запускают патогенетические процессы и в дальнейшем не детектируются в системном кровотоке, мы исследовали функциональные и резервные возможности мононуклеарных клеток периферической крови к конститутивной гиперпродукции медиаторов воспаления первой волны IL-17, IL-1β, TNFα в зависимости от однонуклеотидных полиморфизмов в промоторных регионах соответствующих генов [1, 7, 9].

Лимфоидные клетки и, в частности НК, способны не только продуцировать цитокины, но и проявлять цитотоксические свойства: в норме НК утилизируют пенистые клетки, предотвращая тем самым выпадение кристаллов холестерина и формирование атеросклеротической бляшки (АБ). Снижение цитотоксической активности НК и накопление в интимае сосудов пенистых клеток, образующихся из моноцитов/макрофагов и миоцитов при участии медиаторов иммунной системы – провоспалительных цитокинов, является одним из ключевых этапов в развитии атеросклероза [3, 6, 8]. Оверэкспрессия медиа-

торов воспаления первой волны мононуклеарами периферической крови длительно поддерживает острое и хроническое воспаление в интима коронарных сосудов, способствуя прогрессированию течения атеросклероза [1]. Снижение цитотоксической активности мононуклеаров периферической крови вследствие изменения соотношения субпопуляций NK в свою очередь усугубляет клинические проявления ССЗ [3, 6, 8].

Полученные экспериментальные данные подтверждают конститутивный дисбаланс фенотипически и функционально различающихся CD56^{hi}CD16⁻/CD56^{lo}CD16⁺ субпопуляций NK с преобладанием CD56^{hi}CD16⁻ фенотипа у больных ИБС (табл. 5). Исследование цитокин-продуцирующей и натуральной киллерной активности РВМС в норме и у больных коронарным атеросклерозом с исходом в ИБС, может способствовать выявлению новых мишеней для таргетной терапии и эффективного лечения атеросклероза.

Заключение

Иммуновоспалительные механизмы развития коронарного атеросклероза ассоциированы с единичными нуклеотидными заменами — полиморфизмами в промоторных регионах генов медиаторов острого и хронического воспаления *IL-17A (G197A)*, *IL-1β (T511C)*, *TNFα (G308A)*. Генетически детерминированная гиперэкспрессия *IL-17A*, *IL-1β* и *TNFα*, подтвержденная в экспериментах по оценке спонтанной и стимулированной продукции цитокинов у больных ИБС в сочетании со сниженной NK-активностью РВМС вследствие преобладания CD56^{hi}CD16⁻ субпопуляции, характеризующейся высокой продукцией цитокинов, проявляется повышением амплитуды провоспалительного компонента (острого и хронического), возможно запускающего и длительно поддерживающего патофизиологические процессы развития атеросклероза.

Список литературы / References

1. Дутова С.В., Саранчина Ю.В., Карпова М.Р., Килина О.Ю., Польша Н.Г., Кулакова Т.С., Ханарин Н.В. Цитокины и атеросклероз – новые направления исследований // Бюллетень сибирской медицины, 2018. Т. 17, № 4. С. 199–207. [Dutova S.V., Saranchina Yu.V., Karpova M.R., Poland N.G., Kulakova T.S., Khanarin N.V. Cytokines and Atherosclerosis – New Research Areas. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2018, Vol. 17, no. 4, pp. 199–207. (In Russ.)]
2. Душкин М.И. Макрофаги и атеросклероз: патофизиологические и терапевтические аспекты // Бюллетень СО РАМН, 2006. № 2 (120). С. 47–55. [Dushkin M.I. Macrophage and atherosclerosis: pathophysiological and therapeutic aspects. *Byulleten SO RAMN = Bulletin SB RAMS*, 2006, no. 2 (120), pp. 47–55. (In Russ.)]
3. Backteman K., Ernerudh J., Jonasson L. Natural killer (NK) cell deficit in coronary artery disease: no aberrations in phenotype but sustained reduction of NK cells is associated with low-grade inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 175, no. 1, pp. 104–112.
4. Dimmeler S., Rippmann V., Weiland U., Haendeler J., Zeiher A.M. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ. Res.*, 1997, Vol. 81, no. 6, pp. 970–976.
5. Fatkhullina A.R., Peshkova I.O., Koltsova E.K. The role of cytokines in the development of atherosclerosis. *Biochemistry*, 2016, Vol. 8, no. 11, pp. 1358–1370.
6. Hak Ł., Myśliwska J., Więckiewicz J., Szyndler K., Trzonkowski P., Siebert J., Myśliwski A. NK cell compartment in patients with coronary heart disease. *Immun. Ageing*, 2007, Vol. 4, no. 1, pp. 1–8.
7. Jongstra-Bilen J., Haidari M., Zhu S.N., Chen M., Guha D., Cybulsky M.I. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 9, pp. 2073–2083.
8. Jonasson L., Backteman K., Ernerudh J. Loss of natural killer cell activity in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2005, Vol. 183, no. 2, pp. 316–321.
9. Libby P., Ridker P.M., Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, Vol. 105, no. 9, pp. 1135–1143.
10. Litvinov D.Y., Savushkin E.V., Dergunov A.D. Intracellular and Plasma Membrane Events in Cholesterol Transport and Homeostasis. *J. Lipids*, 2018, Vol. 2018, 3965054. doi: 10.1155/2018/3965054.
11. Moss J.W.E., Ramji D.P. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med. Chem.*, 2016, Vol. 8, no. 11, pp. 1317–1330.
12. Rafieian-Kopaei M., Setorki M., Douadi M., Baradaran A., Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int. J. Prev. Med.*, 2014, Vol. 5, no. 8, pp. 927–946.
13. Ramji D.P., Davies T.S. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2015, Vol. 26, no. 6, pp. 673–685.

14. Ravnskov U., Navarese E.P., Robinson J.G., Kowalewski M., Kolodziejczak M., Andreotti F., Bliden K., Tantry U., Kubica J., Raggi P., Gurbel P.A.. LDL-C does not cause cardiovascular disease: a comprehensive review of the current literature. *Exp. Review Clin. Pharmacol.*, 2018, Vol. 11, no. 10, pp. 959-970.
15. Seneff S., Davidson R.M., Lauritzen A., Samsel A., Wainwright G. A novel hypothesis for atherosclerosis as a cholesterol sulfate deficiency syndrome. *Theor. Biol. Med. Model.*, 2015, Vol. 12, 9. doi: 10.1186/s12976-015-0006-1.
16. Shim A.L., Aksyonov A.A., Mitrokhin V.M., Lovchikova I.B., Konoplyannikov M.A., Konev A.V., Zotov A.S., Ovchinnikov R.S., Antova E., Mladenov M.I., Kamkin A. Serum interleukin-6: Association with circulating cytokine serum levels in patients with sinus arrhythmia and patients with coronary artery disease. *Cell. Immunol.*, 2016, Vol. 310, pp. 178-183.
17. Veljkovic N., Zaric B., Djuric I., Obradovic M., Sudar-Milovanovic E., Radak D., Isenovic E.R. Genetic Markers for Coronary Artery Disease. *Medicina (Kaunas)*, 2018, Vol. 54, no. 3, 36. doi: 10.3390/medicina54030036.
18. Wong B.W., Meredith A., Lin D., McManus B.M. The Biological Role of Inflammation in Atherosclerosis. *Can. J. Cardiol.*, 2012, Vol. 28, no. 6, pp. 631-641.

Авторы:

Тугуз А.Р. — д.б.н., заведующая иммуногенетической лабораторией, Научно-исследовательский институт комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Шумилов Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем, Научно-исследовательский институт комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Музеня Д.В. — к.б.н., доцент кафедры физиологии и общей патологии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Лысенков С.П. — д.м.н., профессор кафедры физиологии и общей патологии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Смолков И.В. — к.б.н., Научно-исследовательский институт комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Татаркова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем, Научно-исследовательский институт комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Хацац Д.З. — врач-терапевт ГБУЗ РА «Адыгейская республиканская клиническая больница», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия.

Ашканова Т.М. — врач-кардиолог ГБУЗ РА «Адыгейская республиканская клиническая больница», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Authors:

Tuguz A.R., PhD, MD (Biology), Head, Immunogenetic Laboratory, Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Shumilov D.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biomedical Problems, Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Muzhenya D.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Medicine, Maikop State Technological University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Lysenkov S.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Medicine, Maykop State Technological University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Smolkov I.V., PhD (Biology), Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Tatarkova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biomedical Problems, Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Khatsats D.Z., Medical Practitioner, Adyghe Republican Clinical Hospital, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Ashkanova T.M., Cardiologist, Adyghe Republican Clinical Hospital, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation