

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С АУТОИММУННЫМ МИОКАРДИТОМ: КЛИНИЧЕСКИЕ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Кекенадзе Н.Н.^{1, 6, 7}, Шогенов З.С.^{1, 6, 7}, Калинина Е.В.^{1, 6},
Пронина О.А.², Пинегин Б.В.⁴, Земцова М.А.³, Elbeik T.⁵,
Мальцев К.А.^{1, 6}, Гнучев Н.В.⁸, Сучков С.В.^{2, 3}

¹РГМУ, Москва, Россия;

²МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

³ММА им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

⁴ГНЦ "Институт иммунологии", Москва, Россия;

⁵Laboratory of Clinical Microbiology, University of San-Francisco Medical School, S.-F., CA, USA;

⁶Городская клиническая больница №81, Москва, Россия;

⁷Национальный медико-хирургический центр МЗ РФ, Москва, Россия;

⁸Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Резюме. Целью работы явилось сравнительное исследование наиболее значимых параметров субпопуляционной архитектуры клеток крови у больных с различными клиническими формами и вариантами течения миокардита и оценка их патогенетической и клинической значимости в практике врача-терапевта. Нами обследовано 99 больных, а также 40 клинически здоровых доноров. При злокачественном аутоиммунном миокардите выявлено увеличение индексов активации Т/В-лимфоцитов, рост экспрессии активационных маркеров на клетках обеих линий дифференцировки, формирование диспропорций в составе иммунорегуляторных субпопуляций с одновременным возрастанием роли ДК, значительное уменьшение интенсивности апоптоза аутореактивных Т-лимфоцитов. У больных с доброкачественным течением болезни выраженных признаков иммунопатологии не обнаружено. Таким образом, изучение экспрессии активационных маркеров на клетках периферической крови высоко информативный и неинвазивный метод диагностики различных вариантов миокардитов.

Ключевые слова: субпопуляции клеток, миокардит, аутоиммунитет, цитометрия.

Kekenadze N.N., Shogenov Z.S., Kalinina E.V., Pronina O.A., Pinegin B.V., Zemtsova M.A., Elbeik T., Maltsev K.A., Gnuchev N.V., Suchkov S.V.

SUBPOPULATIONAL FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD CELLS IN THE PATIENTS WITH AUTOIMMUNE MYOCARDITIS: CLINICAL AND PATHOGENETIC ASPECTS

Адрес для переписки:

Шогенов Заур Султанович
105554, Москва, ул. Нижняя Первомайская д.24,
кв. 275. Тел.: 484-01-22 (раб), 429-81-78 (дом),
769-28-96 (моб).
E-mail: zshogenov@ibs.ru, ninokka@mail.ru

Abstract. The goal of our research was comparative study of the most important parameters of subset cytoarchitectonics in the patients with the different courses of myocarditis and evaluation of their pathogenetic and clinical value in the practice of the physician. We have investigated 99 patients with myocarditis and 40 healthy donors. In patients with malignant course of

disease we revealed increased activation index of T/B-cells; increased expression of the activation markers on the both lines of differentiation; disproportion in the immunoregulatory subsets with increased role of dendric cells; decreased intensity of the autoreactive T-cells apoptosis. In patients with nonmalignant course of disease expressed signs of immunopathology were not found. Thus, study of activation markers on the cells of the peripheral blood is more informative and noninvasive method of diagnostics of myocarditis. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 517-524)

Введение

Миокардит, будучи хроническим воспалительным заболеванием с прогрессирующим течением, часто выступает в роли предвестника сердечной недостаточности (СН) и дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) с формированием в итоге локализованного аутоиммунного синдрома [11,16, 23, 25, 27]. Достигнутый в последние годы значительный прогресс в понимании патогенеза аутоиммунного миокардита (АМ), где ведущая роль принадлежит сочетанным сдвигам в составе клеточного и гуморального звеньев иммунитета, составил основу современных программ лечебно-реабилитационных мероприятий в практике терапевта-кардиолога [24]. Тем не менее, проблемы ранней и дифференциальной диагностики вариантов течения заболевания сохраняют свою актуальность. Известно, что в самых ранних стадиях заболевания доминируют Th1-лимфоциты, обеспечивающие эффективную работу клеточного звена иммунитета и формирование в ткани миокарда классической картины аутоиммунного воспаления; затем возрастает активность Th2-клеток, ответственных за гуморальный иммунитет, благодаря чему воспаление как феномен иммунопатологии перестает быть объектом единственного интереса, а течение АМ приобретает новые и, в большинстве случаев, затяжные или хронически-рецидивирующие формы, в частности, ДКМП и миокардиосклероз (МКС) [3, 5, 16]. *Целью работы* являлось сравнительное исследование наиболее значимых в патогенетическом отношении параметров субпопуляционной архитектоники клеток периферической крови у больных с различными клиническими формами и вариантами течения АМ и МКС и оценка их патогенетической и клинической значимости в практике врача-терапевта.

2. Материалы и методы

2.1. Пациенты и источник биологического материала

Цельная кровь 99 больных с различными вариантами течения АМ и МКС, а также 40 клинически здоровых доноров (ЗД) получены из ГКБ №81 г. Москвы, Национального медико-хирургического центра МЗ РФ и МОНИКИ. При диагностике миокардитов использовали классификацию Н.Р. Палева с соавт. (2002) и рекомендации НУНА [4, 8]. Диагноз АМ верифицировали при наличии в крови анти-КМ аутоАТ [1, 9, 19]. Первую группу составили 40 больных со злокачественным течением АМ (ЗАМ), что проявлялось выраженной сердечной недостаточностью (функциональный класс (ФК) СН 3,0±0,3), высокой частотой встречаемости нарушений ритма и проводимости с плохо поддающимися коррекции симптомами СН (фракция выброса (ФВ) 25,9±12,1%) (табл. 1). Во вторую группу вошли 23 больных с доброкачественным течением АМ (ДАМ) и менее выраженной СН (ФК СН 2,5±0,6; ФВ 42,5±11,2%); в третью - 36 больных с МКС, признаком которого считали сохранение в течение 12 и более месяцев после перенесенного АМ изменений ЭКГ органического характера (ФК СН 1,64±0,72 и ФВ 44,7±15,2%).

2.2. Методы

Исследование субпопуляционного состава клеток периферической крови проводили в соответствии с разработанным ранее Протоколом путем иммунофенотипирования клеток на проточном цитометре с применением соответствующих моноклональных антител отечественного и зарубежного производства. Позитивность окрашивания клеток анализируемых

Табл. 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ ЗАМ И ДАМ

| Параметр | ЗАМ | ДАМ |
|--|-----------|-----------|
| Возраст (в годах) | 30,5±11,7 | 33,0±5,7 |
| Сроки заболевания (в днях) | 42±15 | 59±25 |
| ФК СН | 3,0±0,3 | 2,5±0,6 |
| ФВ (в %) | 25,9±12,1 | 42,5±11,2 |
| Желудочковая экстрасистолия (в п/%) | 7/58,3 | 4/26,7 |
| Пароксизмальная желудочковая тахикардия (п/%) | 7/58,3 | 3/20,0 |
| Нарушение проводимости (АВ блокады II-III ст., блокада л.н.п. Гиса) (в п /%) | 5/41,6 | 4/26,7 |
| Летальность (в п/%) | 2/16,6 | 0/0 |

популяций мы оценивали путем наложения квадрантов на гистограмму, полученную для клеток, окрашенных негативным изотипическим контролем. В дальнейшем данные квадранты экстраполировались на гистограммы, содержащие позитивные клетки. На гистограммах, полученных по прямому и боковому светорассеянию, легко локализовались клетки как лимфоцитарного, так и моноцитарного рядов дифференцировки, причем, зоны их практически не перекрывались. Это позволило использовать данный подход для введения логических ограничений (*гейтов*) по морфологическим признакам – размерам (*FSC*) и гранулярности (*SSC*). При использовании одноцветного анализа результаты отображались на однопараметрической гистограмме с логарифмической шкалой. При использовании многоцветного анализа данные по каналам флуоресценции отражены на двупараметрических гистограммах. Для анализа популяций с низкой плотностью клеток использовали смешанные линейно-логарифмированные гистограммы типа *SSC/FL*. При анализе данных мы определяли положения кластера клеток в многомерном пространстве. Использование более, чем двух флуорохромов, и выявление на двумерной гистограмме дубль-позитивного кластера позволяло получать четыре варианта экспрессии третьего маркера. При одновременном использовании трех антител, меченных разными флуорохромами, нашими коллегами за рубежом получены до восьми комбинаций положительных и отрицательных популяций, расположение которых в пространстве трехмерных гистограмм (*F11/Fl2*, *Fl2/Fl3*, *Fl3/F11*) было строго фиксированным. Далеко не всегда популяции, позитивные по экспрессии одного маркера, экспрессировали второй маркер также однородно. Для оценки гетерогенности экспрессии маркеров на клетках одной популяции (например, *CD3*, *CD4* или *CD8*) мы использовали различные схемы отображения возможных вариантов *ко-экспрессии* маркеров на двумерной гистограмме. Количественная идентичность в относительных пропорциях популяций с одинаковым итоговым фенотипом, выявленная на таких гистограммах, использовалась в качестве внутреннего контроля качества пробоподготовки. Данная работа была выполнена на проточных цитометрах, соответствующих современным требованиям лабораторной диагностики. Были использованы: модель *FACS Calibur* производства фирмы *Becton Dickinson* (США), модель *Суан* фирмы *DAKO Cytomation* (Бельгия), и модель *FACS Scan* (*Becton Dickinson*, США). В своей работе мы использовали как традиционную двухцветную метку, так и комбинации моноклональных антител, меченных пятью различными флуорохромами. Определение иммунологического фенотипа клеток периферической крови проводилось с использованием широкой панели моноклональных антител, включающей: миелоидные

(*CD11b*, *CD14*, *CD15* и др.); не рестриктированные по линиям дифференцировки (*CD38*, *HLA-DR* и др.); Т-клеточные (*CD2*, *CD3*, *CD4*, *CD8* и др.); В-клеточные (*CD19*, *CD20*, *CD21*, *CD22*, *CD23* и др.). Оценка результатов проводилась на трех разных, вышеуказанных типах цитометров, в разных *клеточных гейтах*, идентифицируемых на основании характеристик светорассеяния. Положительными считались случаи с экспрессией маркеров, превышающих 20% анализируемой популяции. Определение *CD69⁺*-маркера осуществляли с помощью набора “*Fast-Immune*” (*Becton-Dickinson*, США); содержание дендритных клеток (ДК), НК-клеток и ряда других субпопуляций – с учетом рекомендаций, изложенных в работах *Willmann K.* [29], *Metelitsa L.* [22], *Kanda T.* с соавт. [17], *Takamoto T.* с соавт. [26], *Барышникова А.Ю.* [2] и *Toba K.* с соавт. [28]. Всем больным также выполнен объем общелабораторных и инструментальных исследований, необходимый для постановки диагноза АМ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента *t*.

Результаты

Из общего числа больных с миокардитом нами были отобраны пациенты с диагнозом АМ и МКС в рамках критериев, описанных ранее [1, 4, 8, 9, 19, 20]. Результаты этих исследований, иллюстрирующие архитектуру субпопуляционных кластеров с эффекторными и регуляторными свойствами у больных с ЗАМ, ДАМ и МКС, представлены в таблице 2. Наиболее яркие диспропорции в составе субпопуляций, отличающиеся широким диапазоном колебаний, наблюдаются у больных с ЗАМ. Важнейшими критериальными признаками, отражающими особенности субпопуляционной патоархитектоники в этой группе больных являлись: увеличение индексов активации В-клеток (*CD23/CD72*, *CD23/CD20*) (табл. 3); снижение интенсивности апоптоза Т-лимфоцитов, протекающего с участием сигнальной системы *FasL/FasR* и обуславливающее в итоге нарушение контроля со стороны клеточного и гуморального звеньев иммунитета за прогрессированием аутоиммунного синдрома (индексы апоптоза рассчитывались по формулам *CD95/CD3*, *CD27/CD70*); увеличение индексов активации Т-клеток, а именно *CD25/CD3*, *CD69/CD3* и *HLA-DR/CD3* (таб.3), увеличение четырех важнейших субпопуляций ДК, экспрессирующих функционально активные маркеры *CD28*, *CD80*, *CD83*, *CD86* (таб.2). Для пациентов с МКС, составляющих 35% из числа обследованных, характерным является: относительная стабильность размеров кластера ДК, за исключением, субпопуляций с фенотипами *CD1c⁺*, *CD1d⁺*, *CD27⁺* и *CD71⁺*, демонстрирующих тенденцию к росту; значительно меньший, в отличие от ЗАМ, ассортимент

Табл. 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СПЕКТР КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ АУТОИММУННОГО МИОКАРДИТА

| Субпопуляции клеток (в % к общему числу лейкоцитов) | Здоровые доноры | Пациенты с: | | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | АМ (n=99) 100% | ДАМ (n=40) 41% | ЗАМ (n=23) 24% | МКС (n=36) 35% |
| • CD1 ⁺ , % | 6,8±1,2 | 6,5±2,0 | 6,9±2,3 | 19,0±2,7* | 17,9±2,2* |
| CD1c ⁺ , % | 2,2±0,6 | 2,9±0,4 | 3,1±0,4 | 13,7±0,8** | 13,1±0,4** |
| CD1d ⁺ , % | 1,9±0,6 | 2,7±0,6 | 3,0±0,6 | 14,0±0,3*** | 13,0±0,6*** |
| • CD2 ⁺ , % | 6,8±1,2 | 6,3±2,0 | 6,2±1,5 | 17,6±2,4*** | 6,9±1,5 |
| CD2 ⁺ CD150 ⁺ , % | 3,4±1,0 | 3,1±1,0 | 3,0±1,1 | 14,3±1,6*** | 3,5±1,2 |
| • CD3 ⁺ , % | 65,2±7,0 | 63,8±5,9 | 64,5±3,6 | 163,8±3,9* | 159,7±4,5*** |
| • CD4 ⁺ , % | 36,2±4,6 | 35,8±10,9 | 36,3±4,3 | 32,1±4,3 | 37,9±11,4 |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ , % | 17±3 | 119±5 | 18±4 | 122±6*** | 18±3 |
| CD4 ⁺ CD7 ⁺ CD28 ⁻ , % | 3,1±0,8 | 3,2±0,7 | 3,2±0,4 | 3,1±0,9 | 12,8±0,9* |
| • CD7 ⁺ , % | 1,8±0,8 | 1,9±0,6 | 1,7±0,9 | 12,3±1,1** | 11,1±0,3*** |
| • CD8 ⁺ , % | 25,7±6,8 | 26,1±3,2 | 25,2±3,8 | 123,6±2,1* | 132,2±4,3** |
| CD8 ⁺ CD28 ⁺ , % | 6,5±1,2 | 6,4±1,7 | 6,3±2,0 | 5,9±1,9 | 4,1±2,0 |
| • CD11b ⁺ , % | 12,2±4,4 | 12,3±2,0 | 12,0±1,8 | 114,6±2,9** | 117,9±3,5*** |
| • CD11c ⁺ , % | 22,2±9,4 | 23,8±3,4 | 21,2±2,5 | 125,2±4,7** | 127,2±7,1*** |
| • CD14 ⁺ , % | 18,7±7,7 | 17,2±5,0 | 19,1±5,5 | 122,6±4,6*** | 119,3±4,5** |
| CD14 ⁺ CD163 ⁺ | 2,3±1,2 | 2,0±1,1 | 2,4±1,3 | 13,1±1,6** | 14,3±1,8*** |
| • CD15 ⁺ , % | 11,1±3,4 | 12,6±2,7 | 12,1±1,7 | 114,8±3,5** | 10,3±2,1 |
| • CD18 ⁺ , % | 14,2±5,8 | 13,9±2,6 | 15,1±2,1 | 117,5±2,8*** | 122,2±3,7*** |
| • CD19 ⁺ , % | 11,8±4,9 | 11,5±2,2 | 10,7±2,0 | 113,2±2,8** | 115,8±2,9*** |
| • CD20 ⁺ , % | 10,2±5,3 | 9,9±3,0 | 10,4±2,4 | 112,9±2,5*** | 114,3±2,0*** |
| • CD21 ⁺ , % | 4,2±0,8 | 15,1±1,9** | 15,0±1,5** | 18,4±2,6*** | 4,0±1,1 |
| • CD22 ⁺ , % | 13,2±1,9 | 13,9±2,2 | 14,1±2,0 | 115,8±2,9** | 117,3±3,5*** |
| • CD23 ⁺ , % | 2,7±0,6 | 12,9±1,2* | 12,9±0,6* | 17,1±3,2*** | 15,0±2,1*** |
| • CD27 ⁺ , % | 8,2±2,4 | 9,0±2,1 | 8,7±2,9 | 111,2±2,4*** | 112,1±3,5*** |
| • CD28 ⁺ , % | 10,2±2,1 | 111,9±2,2* | 111,4±3,5* | 115,3±3,8** | 10,9±3,1 |
| • CD30 ⁺ , % | 15,1±4,3 | 16,0±3,7 | 15,9±5,7 | 121,2±5,8*** | 117,2±4,7* |
| • CD38 ⁺ , % | 42,8±4,9 | 44,1±4,2 | 43,3±2,9 | 149,4±5,7*** | 146,2±5,0** |
| • CD44 ⁺ , % | 16,5±5,0 | 17,1±4,2 | 17,5±3,6 | 122,3±4,0*** | 120,6±7,1*** |
| • CD44 ⁺ CD62L ⁻ , % | 7,1±1,4 | 7,6±2,5 | 7,3±1,9 | 19,6±1,8*** | 110,2±3,5*** |
| • CD45 ⁺ , % | 6,8±1,2 | 6,6±2,2 | 6,9±1,5 | 18,3±2,8** | 19,9±1,2** |
| CD45R0 ⁺ , % | 3,4±1,0 | 3,5±1,3 | 3,6±1,1 | 15,0±1,6*** | 16,9±2,0*** |
| • CD57 ⁺ , % | 6,8±1,2 | 6,4±2,2 | 6,5±1,5 | 16,1±1,5** | 19,1±2,4*** |
| CD57 ⁺ CD8 ⁺ , % | 12,2±4,1 | 11,9±2,6 | 12,4±2,1 | 110,2±1,7** | 114,9±2,1*** |
| • CD68 ⁺ , % | 12,7±2,6 | 13,1±2,4 | 12,9±3,9 | 117,2±3,4*** | 115,1±2,0** |
| • CD69 ⁺ , % | 38,8±6,9 | 39,3±3,1 | 39,1±4,4 | 142,3±4,0*** | 140,1±3,4** |
| • CD70 ⁺ , % | 10,3±2,7 | 11,4±2,1 | 10,8±2,4 | 113,9±3,7* | 115,7±4,7** |
| • CD71 ⁺ , % | 6,8±1,2 | 7,1±3,9 | 7,3±3,2 | 19,4±2,6** | 110,2±3,6*** |
| • CD80 ⁺ , % | 11,2±3,4 | 11,3±2,0 | 112,0±2,9* | 115,7±2,6** | 12,3±1,7* |
| • CD83 ⁺ , % | 7,6±2,0 | 8,0±2,1 | 18,7±2,4** | 110,1±1,9*** | 8,3±2,5 |
| • CD86 ⁺ , % | 12,0±4,1 | 113,9±2,6 | 13,0±1,9 | 116,2±4,1** | 12,9±2,2 |
| • CD94 ⁺ , % | 6,9±1,2 | 7,2±2,6 | 18,2±2,0** | 111,4±3,9*** | 19,4±2,7** |
| CD8 ⁺ CD94 ⁺ , % | 3,4±1,0 | 3,9±1,7 | 14,8±1,9 | 16,8±3,1*** | 15,6±1,5** |
| • CD95 ⁺ , % | 42,7±12,8 | 140,1±8,3* | 41,4±4,9 | 132,5±11,7*** | 140,1±8,3** |
| • CD96 ⁺ , % | 5,2±2,4 | 5,6±1,8 | 5,4±1,1 | 16,9±3,8* | 17,6±2,9** |
| • CD158a/b ⁺ , % | 8,9±2,1 | 8,7±1,6 | 9,0±1,4 | 15,7±1,6** | 111,2±2,4** |
| CD8 ⁺ CD158 ⁺ , % | 3,4±1,0 | 3,9±1,1 | 3,7±1,8 | 14,2±1,7** | 14,9±1,8** |
| • CD-HLA-DR ⁺ , % | 6,8±1,2 | 7,1±2,2 | 7,3±2,0 | 18,9±2,9* | 110,6±3,1** |
| CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , % | 10,4±5,1 | 10,3±2,3 | 10,6±1,9 | 111,8±2,5** | 113,3±2,8*** |

АМ, ДАМ, ЗАМ и МКС – аутоиммунный миокардит, аутоиммунный миокардит с доброкачественным течением, аутоиммунный миокардит со злокачественным течением и миокардиосклероз, соответственно;

Примечание: Различия между показателями больных и здоровых доноров статистически достоверны (* – p<0,001; ** – p<0,05; *** – p<0,01).

Табл. 3. ИНДЕКСЫ АКТИВАЦИИ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ АУТОИММУННОГО МИОКАРДИТА

| Формулы индексов | ЗД | АМ | ДАМ | ЗАМ | МКС |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| • ИРИ (CD4/CD8) | 1,5±0,4 | 1,6±0,5 | 1,5±0,7 | 12,1±0,7** | 11,2±0,9* |
| • апоптоза: | | | | | |
| CD95/CD3 | 1,6±0,4 | 11,3±0,6* | 11,4±0,3* | 10,8±0,4** | 11,0±0,3** |
| CD27/CD70 | 0,8±0,2 | 0,8±0,2 | 0,8±0,3 | 0,8±0,4 | 0,7±0,3 |
| • активации В-клеток: | | | | | |
| CD23/CD72 | 0,28±0,09 | 0,31±0,01 | 0,33±0,04 | 10,64±0,18** | 10,40±0,17** |
| CD23/CD20 | 0,21±0,05 | 0,22±0,11 | 0,26±0,08 | 10,48±0,09*** | 10,31±0,09*** |
| • активации Т-клеток: | | | | | |
| CD25/CD3 | 0,05±0,01 | 0,08±0,02 | 0,08±0,01 | 10,16±0,04** | 10,06±0,03** |
| CD69/CD3 | 0,60±0,28 | 0,61±0,23 | 0,58±0,23 | 10,73±0,15*** | 10,69±0,27** |
| HLA-DR/CD3 | 0,11±0,04 | 0,18±0,08 | 0,14±0,09 | 10,24±0,12** | 10,21±0,11** |

субпопуляций, проявляющий тенденцию к росту и наличие клеток (CD7⁺-лимфоциты), доля которых заметно сокращена; преобладание клеток как лимфоидного, так и моноцитарно-макрофагального ряда дифференцировки с неканоническими функциями; дисбаланс в составе иммунорегуляторных субпопуляций с тенденцией к формированию аутоиммунных нарушений, но значительного меньшего масштаба и иного содержания (при росте клеток с фенотипом CD8⁺-супрессоров и стабильной численности CD4⁺-хелперов, ИРИ (CD4/CD8) снижается, тогда как величины индексов активации В- и Т-лимфоцитов остаются, как и в случае ЗАМ, высокими по сравнению с группой доноров); на этом фоне отмечен менее интенсивный рост меньшего числа субпопуляций, несущих основные костимуляторные молекулы (только клетки с фенотипами CD23⁺ и CD27⁺), экспрессирующие активационные маркеры (клетки с фенотипами CD30⁺, CD38⁺, CD69⁺, CD71⁺, CD158^{a/b}, HLA-DR⁺ и HLA-DR⁺CD3⁺) и вспомогательные молекулы для межклеточной адгезии и кооперации (CD11c⁺, CD18⁺, CD22⁺, CD44⁺, CD44⁺CD62L⁺, CD70⁺, CD96⁺), а также субпопуляций с фенотипом CD45R0⁺ (иммунные клетки памяти); менее выраженное, по сравнению с ЗАМ, снижение интенсивности апоптоза Т-лимфоцитов, протекающего по сигнальному пути системы *FasL/FasR*. Также продемонстрированы ассоциативные взаимосвязи для клеток с активационными фенотипами CD28⁺, CD80⁺ и CD23⁺, с одной стороны, и цитотоксическими клетками с фенотипами CD94⁺ и CD8⁺CD94⁺, с другой, для больных с ДАМ, и для более широкого диапазона клеток с обеих сторон (CD28⁺, CD80⁺, CD2⁺, CD2⁺CD150⁺, CD23, CD4⁺CD25⁺, CD30⁺, CD69⁺, CD71⁺, CD158^{a/b}, HLA-DR⁺, HLA-DR⁺CD3⁺, CD68⁺, CD71⁺, CD14⁺CD163⁺) для пациентов с ЗАМ. в группе с ЗАМ обнаружена и обратная зависимость. На фоне роста большинства клеток с активационными фенотипами отмечено снижение числа высокоспециализированных цитотоксических клеток с фенотипами CD57⁺, CD8⁺CD57⁺, CD94⁺, CD8⁺CD94⁺, CD158⁺, CD8⁺CD158⁺ (табл.2).

Обсуждение

Сравнительный анализ полученных нами данных дает основание говорить о том, что для большинства больных с АМ (особенно, для ЗАМ и МКС) характерна типичная картина аутоиммунного синдрома, затрагивающего эффекторные и регуляторные звенья иммунитета, что подтверждает целый ряд фактов, среди которых ключевое значение для ЗАМ и МКС имеют увеличение индексов активации Т/В-лимфоцитов, рост экспрессии активационных маркеров на клетках обеих линий дифференцировки, формирование диспропорций в составе иммунорегуляторных субпопуляций с одновременным возрастанием роли ДК, значительное уменьшение интенсивности апоптоза аутореактивных Т-лимфоцитов, что согласуется с мнением большинства исследователей, подчеркивающих исключительную значимость механизмов Th1-зависимой аутоагрессии против миокарда в патогенезе АМ [1]. У больных с ДАМ выраженных признаков иммунопатологии не обнаружено, в связи с чем, данную группу можно рассматривать как самостоятельный вариант течения АМ, требующий индивидуального подхода к разработке патогенетически обоснованных, но иных лечебно-реабилитационных мероприятий. Для АМ, в первую очередь, ЗАМ уже на ранних стадиях характерно существенное повышение содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры - свидетелей мобилизации ресурсов Т-звена иммунитета, а позднее, аналогичных свидетелей активации В-звена. По мнению ряда авторов, к одним из наиболее значимых в этом плане иммунорегуляторных Т-клеток принадлежат CD4⁺-лимфоциты, активно участвующие в формировании начальных стадий аутоиммунного конфликта при АМ [5,6]. Возникновение в составе этой группы клеток аномалий ведет к развитию тяжелых аутоиммунных нарушений. Весьма интересной представляется и субпопуляция с фенотипом CD30⁺, имеющая тенденцию к динамике при АМ и связанная с целым рядом других субпопуляционных параметров - свидетелей активации ДК и Т-звена иммунитета. Еще одной суб-

популяцией, способной влиять на процессы реализации физиологических эффектов, являются $CD44^+ CD62L^+$ Т-лимфоциты, несущие рецепторы к компоненту и участвующие на определенных стадиях развития АМ в индукции комплемент-зависимой цитотоксичности и процессах активации и пролиферации аутореактивных к миокарду Т-клеток. Содержание в крови вышеуказанных клеток возрастает в случаях ЗАМ и МКС одновременно с ростом других субпопуляций, экспрессирующих активационные маркеры. Важное место занимает появление в крови больных с АМ значительного числа $CD45R0^+$ Т-лимфоцитов, способных прилипать к компонентам микроокружения и выполняющих функции Т-клеток памяти или индукторов Т-хелперов [7, 8]. Обнаруженное нами высокое содержание такого рода клеток в периферическом кровотоке больных с ЗАМ и МКС связано с увеличением плотности клеток указанной субпопуляции в составе воспалительного клеточного инфильтрата, формируемого в очагах поражения сердечной мышцы. Особый интерес вызывают НК-клетки, составляющие гетерогенную популяцию лимфоцитов с широким спектром мишеней для атаки. На фоне стабильной численности определенной части НК-клеток с каноническими фенотипами, отмечено возрастание ряда особых субпопуляций – с фенотипами $CD8^+CD57^+$ и $CD4^+CD7^-CD28^-$ [9]. Не исключено, что именно эти специализированные клетки-киллеры могут являться активными участниками событий на самых ранних стадиях развития АМ, фокусируя свой цитотоксический потенциал в зоне воспаления и определяя, в значительной степени, тяжесть заболевания и его неблагоприятный прогноз. В роли партнера НК-клеток на ранних стадиях АМ могут выступать лимфокин-активированные клетки-киллеры (ЛАК) и субпопуляция с фенотипом $CD8^+CD28^-$, способная секретировать субстанции с цитолитическими свойствами и вызывать активную деструкцию миокарда с формированием ДКМП с переходом в дальнейшем в МКС [10]. Продемонстрированные нами ассоциативные связи между содержанием в крови субпопуляций, экспрессирующих маркеры активации, с одной стороны, и течением АМ и МКС, с другой, позволят дать обоснованную клиническую оценку взаимосвязей между субпопуляционными фенотипами и формированием той или иной формы АМ. Для больных с ЗАМ и МКС отличительной особенностью являются и признаки гиперфункции В-звена, проявляющей себя в увеличении численности зрелых В-лимфоцитов, что типично для формирования аутоиммунного синдрома. При этом интересно, что на фоне роста большинства субпопуляций с В-клеточными фенотипами у больных с ЗАМ и МКС количество $CD7^+$ -лимфоцитов при МКС снижено. Обнаруженные нами сдвиги в иммунорегуляторном и эффекторном звеньях иммунитета сочетаются при ЗАМ и, отчас-

ти, МКС с низкими индексами апоптоза циркулирующих в крови Т-лимфоцитов, а само содержание в крови $CD95^+$ -лимфоцитов у больных с ЗАМ снижено в 1,4-1,6 раза, а при МКС – в 1,2-1,4 раза по сравнению с ЗД. Вопрос этот изучен недостаточно, в связи с чем анализ ассоциативных взаимосвязей показателей апоптоза лимфоцитов и клинико-патоморфологических особенностей конкретной формы АМ стали объектом интенсивных исследований [11, 12]. В случае ЗАМ одним из важнейших иммунологических критериев прогрессирования процесса является обогащение периферической крови субпопуляциями ДК, гиперфункция которых обуславливает нарушение процессов презентации аутоАГ клеткам иммунной системы, а, в конечном итоге, формирование признаков аутоиммунного синдрома. Самостоятельный интерес представляет факт увеличения в крови больных субпопуляций, несущих адгезионные молекулы, участвующих в реализации миграционных свойств клеток и обеспечивающих сложный механизм взаимодействия иммуноцитов с компонентами внеклеточного матрикса и регулирующих, тем самым, характер и интенсивность аутоиммунного воспалительного процесса в очагах поражения миокарда. Среди клеток с адгезионными фенотипами тенденцию к росту у больных с ЗАМ и МКС проявили в разных диапазонах большинство субпопуляций, а через взаимодействие с клетками, экспрессирующими, помимо адгезинов, различные рецепторы к адгезионным и костимуляторным молекулам, возможно осуществлять контроль за миграцией Т-лимфоцитов и макрофагов через эндотелий сосудов, что может играть важную роль в патогенезе ранней фазы АМ. Не исключено, что в ближайшем будущем участие клеток, экспрессирующих молекулы адгезии, в патогенезе АМ станет важнейшей составляющей в создании новой терапевтической идеологии в лечении АМ и других заболеваний аутоиммунного генеза [13]. Прогрессирование АМ и риск хронизации заболевания с трансформацией в ДКМП или МКС зависят от формы иммунопатологии, в том числе, от субпопуляционной архитектоники клеток периферической крови, определяющей, в значительной степени, особенности патогенеза и клиническую картину заболевания. При этом содержание в периферическом кровотоке отдельных субпопуляций и, более того, их комбинации в составе определенных клеточных кластеров обнаруживают ассоциативную зависимость как между отдельными кластерами в пределах анализируемой численности субпопуляционных параметров, так и между кластерами и клинико-иммунологической формой и/или вариантом течения заболевания. При анализе межкластерных взаимоотношений наиболее значимые взаимосвязи установлены в группе с ЗАМ для активационных и костимуляторных маркеров, с одной стороны, и маркеров ДК, с другой. При МКС такого рода связь свое

значение утрачивает в силу нормализации в кровотоке значительной доли регуляторных субпопуляций с фенотипом ДК. Следует заметить, что для активационных и костимуляторных маркеров и степени агрессивности основного заболевания (при ЗАМ отмечалось увеличение всех маркеров, а при ДАМ рост ограничился двумя - CD28⁺ и CD80⁺) также установлены значимые взаимосвязи. В то же время у больных с МКС, отличающихся по характеру течения от остальных пациентов, были выявлены субпопуляции с иными активационными маркерами, а именно, CD38⁺, CD69⁺ и HLA-DR⁺, динамика которых обнаруживала прямую ассоциативную зависимость с другими клиническими параметрами – частотой обострения АМ и развитием экстракардиальных очагов поражения. Не менее существенной является выявленная нами ассоциативная зависимость между содержанием клеток, экспрессирующих активационные маркеры, и клеток с цитотоксическими функциями. Механизмы цитотоксичности при аутоиммунном синдроме, как известно, имеют решающее значение для прогрессирования АМ и ухудшения сократительной функции миокарда. В этой связи весьма показательным является еще один пример ассоциативности - при положительной динамике большинства цитотоксических клеток с каноническими фенотипами течение болезни приобретает злокачественный характер в случае активной формы АМ и прогрессирующую форму - в случае МКС. Для клеток с активационными фенотипами HLA-DR⁺ и CD8⁺ установлены еще два примера ассоциативности с клинической картиной заболевания - в обоих случаях корреляция затрагивает вышеуказанные субпопуляции, однако, если в группе больных с ЗАМ HLA-DR⁺-клетки коррелируют со степенью агрессивности в прямом направлении, а CD8⁺-клетки – в обратном, то у пациентов с МКС положительная динамика в крови вышеуказанных клеток сопровождается прогрессированием заболевания и развитием экстракардиальных очагов поражения. При ДАМ какие-либо ассоциации такого рода нами не выявлены. Весьма интересны прямые взаимосвязи между активностью и степенью агрессивности АМ, с одной стороны, и динамикой клеток еще с одним активационным фенотипом CD21⁺ - если при ДАМ отмечается едва видимый рост численности указанной субпопуляции, то в группе с ЗАМ выявляется выраженное увеличение числа CD21⁺. У больных с МКС ассоциативность такого рода отсутствовала. Можно, таким образом, полагать, что экспрессируемый на ДК и В-лимфоцитах CD21⁺-маркер, являющийся рецептором для комплемента, приобретает ключевое значение для активации В-клеток и индукции механизмов комплемент-зависимой АТ-опосредованной цитотоксичности, в первую очередь, при прогрессировании АМ, что и наблюдается при ЗАМ [15]. Существенное значение для лечащего врача имеет обна-

руженная нами прямая ассоциативная зависимость между степенью агрессивности заболевания в случае ЗАМ и прогрессирования МКС с одной стороны и динамикой клеток с фенотипом CD44⁺, определяющих характер межклеточных контактов в зоне воспалительного очага, с другой. При ДАМ такая связь отсутствует. И, наконец, еще одним примером ассоциативной зависимости является взаимосвязь между снижением апоптотического индекса, наиболее выраженном при ЗАМ, и сокращением численности CD3⁺-лимфоцитов при нормальном количестве клеток с фенотипом CD4⁺. Следует в этой связи заметить, что, помимо вышеуказанной зависимости межклеточного характера, нами выявлена взаимосвязь между отрицательной динамикой индексов апоптоза и развитием агрессивных форм АМ (в случае ЗАМ) и скоростью прогрессирования заболевания и развитием экстракардиальной патологии в случае МКС.

Заключение

Вышеприведенные данные создают объективные предпосылки для развития новых методов иммунодиагностики АМ и его последствий. Изучение экспрессии активационных маркеров на клетках периферической крови имеет значительные преимущества по сравнению с изучением эндомикардиальных биоптатов, оснащая врача общей практики, в сущности, неинвазивным методом иммунодиагностики, позволяющим осуществлять мониторинг за состоянием иммунной системы пациента и проводить обоснованный подбор терапии.

Список литературы

1. Амелюшкина В.А. Биохимические маркеры повреждения миокарда // Клин. лаб. диагностика. - 1999. - №7. - С. 25-32.
2. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематол. трансфузиол. - 1990. - № 8. - С. 4-7.
3. Палеев Н.Р., Палеев Ф.Н. Цитокины и их роль в патогенезе заболевании сердца. Клиническая медицина. - 2004. - Т. 82, № 5. - С. 4-7.
4. Палеев Н.Р., Гуревич М.А. Некоронарогенные заболевания миокарда. Состояние проблемы // Клин. мед. - 1998. - № 9. - С. 4-8.
5. Палеев Ф.Н. Популяционный и субпопуляционный состав и экспрессия активационных маркеров лимфоцитов при инфекционно-аллергическом миокардите // Кардиол. - 1999. - Т. 39, № 8. - С. 53-58.
6. Порядин Г.В., Палеев Н.Р., Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Макаров А.И., Санина Н.П., Палеев Ф.Н. Динамическая характеристика поверхност-

ного фенотипа лимфоцитов периферической крови у больных миокардитом // Рос. иммунол. ж. - 1999. - Т.4, № 2. - С. 165-170.

7. Порядин Г.В., Макаров А.И., Салмаси Ж.М. // Пат. физиол. и эксперим. тер. - 1997. - № 1. - С. 42-45.

8. Ройтберг Г.Е., Струтынский А.В. // "Внутренние болезни. Сердечно-сосудистая система". М.: Издательство БИНОМ, 2003. - С. 856.

9. Сапрыгин Д.Б., Романов М.Ю. Миокардиальные маркеры. Традиционные и современные тест программы. Диагностическая специфичность // Лаб. бор. мед. - 1999. - №2. - С. 16-23.

10. Ana Paula M.P. Marino, Maria Inks P. Azevedo, Joseli Lannes-Vieira. Differential Expression of Adhesion Molecules Shaping the T-cell Subset Prevalence during the Early Phase of Autoimmune and Trypanosoma cruzi-elicited Myocarditis // Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. - Vol.98, N7. - P. 945-952.

11. Angelini A., Crosato M., Boffa G.M., Calabrese F., Calzolari V., Chioin R., Daliento L., Thiene G. Active versus borderline myocarditis: clinicopathological correlates and prognostic implications // Heart. - 2002. - 87. - P. 210-215.

12. Banchereau J., Pascual V., Palucka A.K. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation // Immunity, 2004. - Vol.20, N5. - P. 539-550.

13. Bohbot A., Feugeas O., Cuillerot J.M., Grosse A., Rusciani I., Faradji A., Oberling F. Peripheral blood CD34+ cells: method of purification and ex vivo expansion // Nouv. Rev. Fr. Hematol., 1995. - Vol.37, N6. - P. 359-365.

14. Boyüm A. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media // Methods Enzymol., 1984. - Vol.108. - P. 88-102.

15. Brigl M., Brenner M.B. CD1: antigen presentation and T cell function // Annu. Rev. Immunol., 2004. - N22. - P. 817-890.

16. Huber S. T cells in coxsackievirus-induced myocarditis // Viral. Immunol., 2004. - Vol 17, N2. - P. 152-164.

17. Kanda T., Yokoyama T., Ohshima S., Yuasa K., Watanabe T., Suzuki T., Murata K. T-lymphocyte subsets as noninvasive markers of cardiomyopathy // Clin. Cardiol., 1990 Sep. - Vol.13, N9. - P. 617-622.

18. Kaya Z., Afanasyeva M., Wang Y., Dohmen K.M., Schlichting J., Tretter T., Fairweather D., Holers V.M.,

Rose N.R. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. // Nat Immunol, 2001. - Vol. 2, N8. - P.739-745.

19. Lieberman E.B., Hutchins G.M., Herskowitz A., Rose N.R., Baughman K.L. Clinicopathologic description of myocarditis // J. Am. Coll. Cardiol., 1991 Dec. - Vol. 8, N. 7. - P.1617-1626.

20. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // Immunochemistry, 1965 Sep. - Vol. 2, N3. - P.235-254.

21. Mason J.W. Myocarditis // Adv. Intern. Med., 1999. - Vol. 44. - P. 293-310.

22. Metelitsa L.S. Flow cytometry for natural killer T cells: multi-parameter methods for multifunctional cells // Clin. Immunol., 2004. - Vol.110, N3. - P.267-276.

23. Pummerer C.L., Grassl G., Sailer M., Bachmaier K.W., Penninger J.M., Neu N. Cardiac myosin-induced myocarditis: target recognition by autoreactive T cells requires prior activation of cardiac interstitial cells // Lab. Invest., 1996 May. - Vol. 74, N5. - P.845-852.

24. Schmaltz A.A., Kandolf R. Myocarditis in childhood: results of a decade's research // Klin. padiatr., 2001 Jan-Feb. - Vol. 213, N1. - P. 1-7.

25. Stefan D. Anker, Stephan von Haehling. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview // Heart, 2004. - Vol. 90. - P. 464-470.

26. Takamoto T., Hori Y., Yokoyama M.M., Koga Y., Toshima H. Lymphocyte subsets in patients with dilated cardiomyopathy and perimyocarditis // J. Clin. Lab. Immunol., 1986. - Vol.19, N3. - P. 113-116.

27. Taylor J.A., Havari E., McInerney M.F., Bronson R., Wucherpfennig K.W., Lipes M.A. A spontaneous model for autoimmune myocarditis using the human MHC molecule HLA-DQ8 // J. Immunol., 2004. - Vol.172, N4. - P. 2651-2658.

28. Toba K., Koike T., Shibata A., Hashimoto S., Takahashi M., Masuko M., Azegami T., Takahashi H., Aizawa Y. Novel technique for the direct flow cytometric analysis of human basophils in unseparated blood and bone marrow, and the characterization of phenotype and peroxidase of human basophils // Cytometry, 1999. - Vol. 35, N 3. - P. 249-259.

29. Willmann K. Flow-cytometric immune function methodology for human peripheral blood dendritic cells // Methods Mol. Biol., 2003. - Vol.215. - P. 41-57.

поступила в редакцию 07.04.2005

отправлена на доработку 15.07.2005

принята к печати 20.08.2005