

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

**Турмова Е.П.¹, Маркелова Е.В.¹, Силаев А.А.²,
Лукьянов П.А.³, Чикаловец И.В.³**

¹ ГБОУ ВПО «Тихоокеанский медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток, Россия

² Медицинский центр Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток, Россия

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

Резюме. Проведено исследование содержания цитокинов: IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF α , IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, IL-2, IL-17, растворимых рецепторов к цитокинам: IL-2R, IL-6R, TNF α RI и TNF α RII; общего холестерина крови; показателей деградации межклеточного матрикса: металлопротеиназы-9; тканевого ингибитора MMP-9 – TIMP 1 типа; комплексов MMP-9/TIMP1 и MMP-9/TIMP2 у 260 пациентов с клинически выраженными проявлениями атеросклероза коронарных артерий и нижних конечностей. У пациентов с атеросклерозом выявлено увеличение содержания в сыворотке крови IL-6, TGF- β 2, TNF α RI и TNF α RII, IL-2R, снижение уровня IL-2 и IL-10 и увеличение значений комплекса MMP-9/TIMP-2. Обнаружены прямые корреляции: MMP-9 с IL-1 β ; комплекса MMP-9/TIMP-1 с IL-1 β , IL-2, IL-2R, IL-17, IL-10; TIMP-1 с TNF α , IL-2 и IL-2R. При высоком уровне общего ХС зарегистрировано повышение продукции: TNF α , IL-17, TGF- β 1, нарастание уровня IL-2, IL-10, MMP-9, TIMP-1, снижение содержания растворимых рецепторов к TNF α I и II типов в сыворотке крови пациентов. Установлены прямые корреляции уровня общего ХС крови с IL-2, IFN γ , MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-2 и обратные с TNF α RI и TNF α RII.

В ходе проведенного исследования уточнен функциональный дисбаланс про- и противовоспалительных механизмов иммунного реагирования при клинически выраженном атеросклерозе, выявлены взаиморегулирующие связи между цитокинами, уровнем общего ХС крови и маркерами деградации межклеточного матрикса.

Ключевые слова: атеросклероз, иммунная система, гиперлипидемия, цитокины, металлопротеиназы

Авторы:

Турмова Е.П. — к.м.н., ассистент кафедры физиологии человека ГБОУ ВПО «Тихоокеанский медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток, Россия

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии человека ГБОУ ВПО «Тихоокеанский медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток, Россия

Силаев А.А., — к.м.н., врач анестезиолог-реаниматолог, заведующий центром анестезиологии и реанимации, Медицинский центр Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток, Россия

Лукьянов П.А. — д.х.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии неинфекционного иммунитета, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

Чикаловец И.В. — к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии неинфекционного иммунитета, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

Адрес для переписки:

Турмова Екатерина Павловна
к.м.н., ассистент кафедры физиологии человека ГБОУ ВПО
«Тихоокеанский медицинский университет» Минздрава России
690002, Россия, Приморский край, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел./факс: 8 (423) 245-07-00.
E-mail: eturmova@mail.ru, patphis-vl@mail.ru

Поступила 18.04.2014
Отправлена на доработку 20.04.2014
Принята к печати 30.04.2014

© Турмова Е.П. и соавт., 2014

Введение

Проблема атеросклероза (АС) является одной из самых актуальных в современной медицине в связи с его широкой распространенностью, продолжительностью латентного периода течения и выраженностью неблагоприятных исходов [12, 16, 22]. АС представляет собой хроническое воспалительное заболевание, преимущественно средних и крупных артерий, характеризующееся аутоиммунным ответом на повреждение артериальной стенки с нарушением метаболизма липидов [16]. Известно, что цитокины, являясь молекулами межклеточного взаимодействия, опосредованно принимают участие в регуляции большинства биохимических процессов в организме: обмене холестерина, образовании и инактивации кислородных радикалов, реакциях ремоделирования сосудистой стенки с участием металлопротеиназ [5, 8, 18]. При этом сохраняется противоречивость мнений в отношении роли цитокиновой регуляции в атерогенезе.

Целью исследования явилась оценка изменений системы цитокинов и установление взаимосвязей цитокинового статуса с маркерами деградации межклеточного матрикса и уровнем общего холестерина крови у пациентов с атеросклерозом.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 260 пациентов с атеросклерозом – (220 мужчин [84,6 %] и 40 женщин [15,8%]). Среди обследованных были пациенты с атеросклеротическим поражением коронарных артерий с выраженным клиническим проявлением ишемической болезни сердца АКА (ИБС) – 140 человек (115 мужчин [82,1%] и 25 женщин [17,9%]) и пациенты с системным атеросклерозом (СА), с поражением сосудов нижних конечностей (облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей – [ОАНК]), без выраженных клинических проявлений ИБС на момент обследования (СА [ОАНК + ИБС]) – 120 человек (105 чел. [87,5%] мужчин и 15 чел. [12,5%] женщин). Контрольную группу составляли 50 практически здоровых доноров (30-50 лет), сопоставимых по полу, без клинических проявлений АС, острых и хронических заболеваний в фазе обострения, не курящих, не употребляющих каких-либо лекарственных препаратов, не злоупотребляющих алкоголем.

Анализ содержания показателей системы цитокинов, ММР-9, ее тканевого ингибитора 1 типа, комплексов ММР-9/ТИМР-1, ММР-9/ТИМР-2 в сыворотке крови проводился методом сэндвич-варианта ИФА, с использованием ре-

активов «R&D Diagnostics Inc.», USA. Уровень общего холестерина крови (ХС) исследовали с помощью стандартного колориметрического метода с использованием реагентов «Ольвекс диагностика» (Россия). Результаты описательной статистической обработки представляли в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_{25} - Q_{75}). Достоверность различий уровня цитокинов оценивали с помощью критерия Манна–Уитни с помощью программы StatPlus (2009). Зависимость между показателями вычисляли методом ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

При определении уровня провоспалительных цитокинов в общей группе пациентов с АС было зафиксировано достоверное увеличение значений IL-6 (табл. 1).

При этом не было обнаружено повышения содержания IL-6R и корреляционной связи IL-6 с его лигандом. Также не установлено статистически значимого увеличения системного уровня IL-1 β , TNF α и IFN γ у пациентов с АС, изменения носили характер тенденции (табл. 1). Выявлено повышение уровня растворимых рецепторов к TNF α (TNF α RI и TNF α RII) в сыворотке крови пациентов. Обнаружена корреляция TNF α только с его растворимым рецептором TNF α RII ($r = 0,42$, $p = 0,03$). При этом в группе пациентов с АС установлена прямая сильная связь между TNF α RI и TNF α RII ($r = 0,82$, $p = 0,001$), тогда как в группе здоровых доноров не было выявлено взаимосвязи между показателями.

При анализе содержания иммунорегуляторных цитокинов у пациентов с АС, зарегистрировано, что уровень IL-2 был в 3 раза ниже, чем у здоровых доноров (табл. 2).

Зафиксировано достоверное увеличение значений растворимого рецептора к IL-2 (IL-2R), за счет которого цитокин реализует свое действие на мембране клеток мишеней (табл. 2). Установлена средняя корреляция между цитокином и его рецептором ($r = 0,30$, $p = 0,005$). При исследовании IL-17 у пациентов с АС не установлено достоверных отличий его уровня от референсных показателей.

При оценке содержания противовоспалительных цитокинов у пациентов с АС, выявлен низкий уровень IL-10 ($p = 0,04$) и увеличение значений TGF- β_2 ($p = 0,05$).

Установлена средняя прямая корреляция ($r = 0,40$, $p = 0,002$), между изоформами TGF- β_1 и TGF- β_2 .

По результатам биохимического анализа крови было установлено, что у 134 (51,5 %) пациен-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АС И У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

| Показатель | Пациенты с АС | Здоровые доноры | Уровень значимости (p) |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| IL-1 β , пг/мл | 4,6* (0,9-9,5) | 1,2 (0,5-9,2) | 0,09 |
| TNF α , пг/мл | 7,0 (2,4-12) | 4,8 (2,2-7,9) | 0,08 |
| TNF α RI, пг/мл | 983,1 (910,2-1051,0)* | 712,3 (703,3-814,1) | 0,03 |
| TNF α RII, пг/мл | 3693,2 (3273,1-4315,7)* | 3000 (2895,2-3150,4) | 0,04 |
| IL-6, пг/мл | 5,2 * (1,0-9,7) | 1,6 (0,4-2,8) | 0,02 |
| IL-6R, нг/мл | 8,5 (8,2-8,8) | 8,5 (8,7-9,0) | 0,2 |
| IFN γ , пг/мл | 8,4 (1,4-16,8) | 5,0 (3,8-14,5) | 0,07 |

Примечание. Результаты представлены в виде Медианы, нижнего и верхнего квартилей Me (Q₂₅-Q₇₅). p – достоверность различий между пациентами с АС и здоровыми донорами; * – различия между исследуемыми группами достоверны.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АС И У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

| Показатель | Пациенты с АС | Здоровые доноры | Уровень значимости (p) |
|--------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| IL-2, пг/мл | 2,9* (0,5-17,6) | 9,0 (3,7-19,9) | 0,05 |
| IL-2R, пг/мл | 499,6* (350,4-698,1) | 356,4 (207,3-464,1) | 0,03 |
| IL-17, пг/мл | 14,3 (6,8-22,9) | 10,5 (7,2-23,6) | 0,09 |

Примечание. Результаты представлены в виде Медианы, нижнего и верхнего квартилей Me (Q₂₅-Q₇₅). p – достоверность различий между пациентами с АС и здоровыми донорами; * – различия между исследуемыми группами достоверны.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АС И У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

| Показатель | Пациенты с АС | Здоровые доноры | Уровень значимости (p) |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| IL-10, пг/мл | 12,8* (5,3-25,1) | 36,7 (20,7-60,1) | 0,04 |
| TGF- β ₁ , нг/мл | 23,4 (16,9-30,2) | 15,1 (12,4-36,8) | 0,9 |
| TGF- β ₂ , пг/мл | 150,4* (127,6-201,2) | 112,2 (106,0-126,4) | 0,05 |

Примечание. Результаты представлены в виде Медианы, нижнего и верхнего квартилей Me (Q₂₅-Q₇₅); p – достоверность различий между пациентами с АС и здоровыми донорами; * – различия между исследуемыми группами достоверны.

тов с АС уровень общего ХС крови был в пределах нормы (менее 5,2 ммоль/л), умеренное повышение его концентрации (от 5,2 ммоль/л до 6,1 ммоль/л) определено у 54 пациентов (20,8%), высокое содержание (более 6,2 ммоль/л) – у 72 человек (27,7%).

Проведен анализ основных групп цитокинов (про-, противовоспалительных и иммунорегуляторных) у пациентов с АС в зависимости от уровня общего ХС крови. Зарегистрировано, что при концентрации общего ХС > 5,2 ммоль/л определялся более высокий уровень TNF α (достоверно выше референсных значений (9,4 [7,0-18,3] пг/мл, против 4,8 [2,2-7,9] пг/мл, $p < 0,05$). При высоком уровне общего ХС показатели TNF α RI и TNF α RII, напротив, были статистически значимо ниже, чем при его низком содержании ($p < 0,05$). Установлена отрицательная корреляция между растворимыми рецепторами к TNF α I и II типа и общим ХС (сильная – между TNF α RI и ХС ($r = -0,78$, $p < 0,05$) и средняя между TNF α RII и ХС ($r = -0,36$, $p < 0,05$). Зарегистрировано, что содержание TGF- β_1 было выше референсных значений только при высоком уровне общего ХС крови (30,7 (22,1-41,2) нг/мл, против 15,1(12,4-36,8) нг/мл ($p = 0,05$). Не выявлено статистически значимых различий в содержании TGF- β_2 при различном уровне общего ХС в крови, оно было выше значений здоровых доноров, как при низкой, так и высокой концентрации ХС. Увеличение общего ХС более 6,2 ммоль/л сопровождалось увеличением значений противовоспалительного IL-10 ($p = 0,04$), по сравнению с уровнем ХС менее 5,2 ммоль/л, при этом показатели цитокина не достигали референсных значений и оставались ниже их ($p = 0,05$). При анализе зависимости содержания иммунорегуляторных цитокинов от концен-

трации общего ХС крови выявлено нарастание уровня IL-2 ($p < 0,05$) и тенденция к снижению его растворимого рецептора, при концентрации общего ХС более 6,2 ммоль/л. Уровень IL-17 также был более высоким при увеличенном содержанием общего ХС в крови (> 6,2 ммоль/л), и превышал при этом показатели контроля ($p = 0,05$).

Для нормального состояния межклеточного матрикса необходимо равновесие между активностью матриксной металлопротеиназы – 9 и ее ингибиторами (TIMP-1 и TIMP-2) [12, 14]. Определено, что у пациентов с АС уровень MMP-9 был несколько выше значений здоровых доноров, однако статистически значимости различий не было установлено ($p > 0,05$) (табл. 4). Зафиксирована тенденция увеличения TIMP-1 ($p = 0,06$), при этом содержание комплекса MMP-9/TIMP1 у пациентов с АС практически не отличалось от референсных показателей ($p < 0,05$), тогда как содержание комплекса MMP-9/TIMP-2 было выше значений здоровых доноров в 11,5 раз.

При проведении корреляционного анализа между содержанием цитокинов и показателями дегградации межклеточного матрикса зарегистрировано: прямая корреляция средней силы между IL-1 β и MMP-9 – ($r = 0,57$, $p = 0,01$), прямая корреляция средней силы между IL-1 β и комплексом MMP-9/TIMP-1 ($r = 0,30$, $p = 0,03$) (рис. 1).

При этом не было выявлено статистически значимой связи между IL-1 β и TIMP-1 ($r = 0,28$, $p = 0,08$). Зафиксирована слабая корреляция между TNF α и TIMP-1 ($r = 0,21$, $p = 0,05$). Выявлены прямые корреляции IL-2 и IL-2R с TIMP-1 ($r = 0,26$, $p = 0,04$ и $r = 0,47$, $p = 0,003$); IL-2 и IL-2R с MMP-9/TIMP-1 ($r = 0,26$, $p = 0,05$ и $r = 0,35$, $p = 0,01$) при АС. Установ-

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ MMP-9, ЕЕ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА TIMP-1, КОМПЛЕКСОВ MMP-9/TIMP-1 И MMP-9/TIMP-2 У ПАЦИЕНТОВ С АС И У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

| Показатели | Пациенты с АС | Здоровые доноры | Уровень значимости (p) |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| MMP-9 (нг/мл) | 288,6 (193,6-361,5) | 241,6 (195,6-391,1) | 0,4 |
| TIMP-1 (нг/мл) | 232,8 (196,2-275,1) | 200,9 (177,6-234,6) | 0,06 |
| MMP-9/TIMP-1 (нг/мл) | 11,2 (9,7-12,3) | 11,8 (7,4-13,1) | 1,4 |
| MMP-9/TIMP-2 (нг/мл) | 35,6* (17,8-123,9) | 3,1 (1,7-4,3) | 0,002 |

Примечание. Результаты представлены в виде Медианы, нижнего и верхнего квартилей Me (Q_{25} - Q_{75}). p – достоверность различий между пациентами с АС и здоровыми донорами; * – различия между исследуемыми группами достоверны.

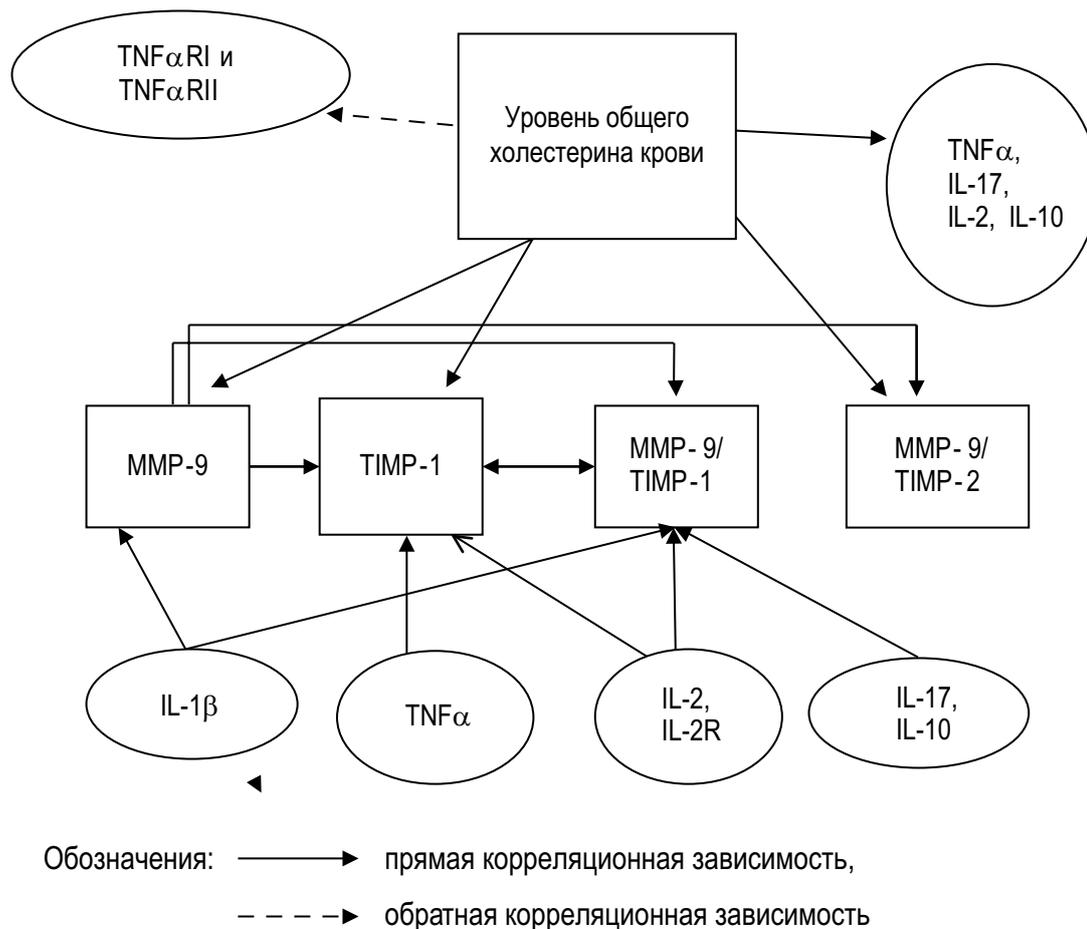


Рисунок 1. Взаимосвязи системного уровня общего холестерина крови, цитокинов, показателей деградации межклеточного матрикса при атеросклерозе

лена прямая слабая корреляция IL-17 и IL-10 с MMP-9/TIMP-1 ($r = 0,30$, $p = 0,01$).

При анализе системы MMP-9 в зависимости от концентрации общего ХС в крови было определено, что при среднем и высоком уровне общего ХС показатели MMP-9, были выше, чем при низком его уровне ($p = 0,02-0,05$), однако при этом они не превышали контрольных значений. Содержание TIMP-1 было выше показателей здоровых доноров только при высокой концентрации общего ХС крови ($p = 0,05$). При анализе системы MMP-9 в зависимости от концентрации общего ХС в крови было выявлено, что при среднем и высоком уровне общего ХС показатели MMP-9, были выше, чем при низком его уровне ($p = 0,02-0,05$), однако при этом они не превышали показатели контроля. Содержание TIMP-1 было выше значений здоровых доноров только при высокой концентрации общего ХС крови ($p = 0,05$). Зафиксирована прямая корреляция слабой силы между MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-2 и уровнем общего ХС ($r = 0,42$, $r = 0,38$, $r = 0,24$, соответственно, $p < 0,05$).

Обсуждение

Выявленное достоверное увеличение значений IL-6 в сыворотке крови пациентов с АС подтверждает участие этого цитокина в поддержании хронического воспаления в артериальной стенке [1, 6, 12, 20]. Отсутствие при этом повышения системного уровня IL-6R и корреляционной связи IL-6 с его лигандом, по нашему мнению, отражает ингибирование провоспалительных эффектов IL-6 реализуемых посредством транс-сигналинга (связью IL-6- IL-6Rco вторичным протеином gp130 на мембране клеток мишеней) [4, 12, 21]. Увеличение уровня растворимых рецепторов к TNF α (TNF α RI и TNF α RII) у пациентов с АС представляет собой механизм компенсации, проявляющийся в связывании TNF α его рецепторами с последующим угнетением биологической активности цитокина, что согласуется с ранее опубликованными данными [3, 12]. Из источников литературы следует, что TNF α RII связан с TNF α в течение короткого промежутка времени, затем происходит разрушение комплекса ли-

ганд-рецептор, с дальнейшим предоставлением места для связывания TNF α RI [1]. Выявленная корреляция TNF α только с его растворимым рецептором TNF α RII ($r = 0,42$, $p = 0,03$) указывает на активацию связывания цитокина преимущественно растворимым рецептором II типа. Обнаружение прямой сильной корреляции между TNF α RI и TNF α RII свидетельствует об активации взаимодействия растворимых рецепторов TNF α между собой. При этом в отношении TNF α RI существуют неоднозначные мнения. По результатам С. Duerrschmid с соавт. (2013), увеличение значений TNF α RI является предиктором развития сердечной недостаточности (СН) и летальности при ИБС [12]. Авторы объясняют формирование декомпенсированного течения СН развитием ангиотензин-II опосредованного кардиального фиброза, реализуемого при участии TNF α RI [12]. Отсутствие статистически значимых изменений показателей: IL-1 β , TNF α , IFN γ и снижение системного уровня IL-2 у пациентов с АС можно объяснить несколькими механизмами: угнетением функциональной активности клеток-продуцентов цитокинов в условиях длительной системной циркуляторной гипоксии и метаболического ацидоза, конкурентным компенсаторным ингибированием противовоспалительными цитокинами, превалированием локальной секреции, приемом статинов пациентами [11, 17, 18]. Снижение IL-2 способствует развитию функционального иммунодефицита по клеточному типу и нарушению адекватного контроля иммунного ответа Т-регуляторными клетками [2]. При этом, выявленное статистически значимое увеличение значений растворимого рецептора к IL-2 (IL-2R) можно охарактеризовать как компенсаторный механизм — реакцию на недостаточность выработки IL-2, но, с другой стороны оно может служить в качестве предиктора аутоиммунного повреждения [2]. Установленная прямая связь средней силы между IL-2 и его растворимым рецептором (IL-2R) подтверждает функционирование взаимодействия лиганд-рецептор при АС.

Считают, что повышение содержания IL-17 способствует проявлению его проатерогенных свойств — усилению продукции макрофагами цитокинов: IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-12p40, активации апоптоза кардиомиоцитов, индукции хемокинов, продукции нейтрофилов, усилению адгезии и проникновения моноцитов и нейтрофилов в артериальную стенку [17, 21], но в то же время, имеются данные о стимулирующем влиянии этого цитокина на выработку противовоспалитель-

ного цитокина — IL-10 и естественного антагониста IL-1 — его растворимого рецептора (IL-1ra) [9]. Отсутствие достоверных отличий уровня IL-17 у пациентов с АС от референсных показателей может свидетельствовать о компенсаторном угнетении функции Th17, их вторичной анергии. Это может быть обусловлено относительной недостаточностью IL-2 и нарушением рецепции IL-6, так как эти цитокины являются активаторами Th17 [9, 10].

Снижение уровня основного противовоспалительного цитокина — IL-10, а также отношения IL-10/IFN γ в крови при АС, косвенно может свидетельствовать о нарушении противовоспалительных механизмов иммунореактивности и угнетении функции Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) в условиях гипоксии.

Согласно данным литературы TGF- β — опосредованно оказывает проатерогенное действие, через угнетение выработки провоспалительных цитокинов [1]. Согласно результатам исследования J.S. Holifield с соавт. (2004), эффект стимуляции ангиогенеза, реализуемый TGF- β_2 осуществляется им только совместно с TGF- β_1 [14]. Зафиксированная прямая связь средней силы между двумя исследуемыми изоформами цитокина (TGF- β_1 и TGF- β_2), подтверждает их взаимодействие между собой. Исходя из этого, увеличение уровня TGF- β_2 , как кофактора TGF- β_1 у пациентов с атеросклерозом можно охарактеризовать как защитный механизм, препятствующий атеросклеротическому повреждению стенки сосудов, снижению воспаления и способствующий увеличению содержания коллагена и стабилизации атеромы [23]. Однако, некоторые авторы, напротив, расценивают увеличение уровня TGF- β_1 в качестве предиктора усиления ишемии миокарда, нарушения процессов ремоделирования и развития фиброза сосудов [9, 10].

Атерогенные классы липопротеинов (хиломикроны, ЛПОНП и, особенно, ЛПНП) являются потенциальными провоспалительными факторами [1, 7]. В то же время нарушение липопротеинового обмена и формирование гиперлипидемий представляет собой важный элемент реактивности организма на воспалительные стимулы [18]. Выявленные почти у половины обследуемых пациентов с клинически выраженными проявлениями ишемии на фоне атеросклероза нормальные показатели холестерина, позволяют судить о том, что гиперхолестеринемия является не обязательным проявлением АС [3], а для развития и прогрессирования заболевания, вероятно, важен не уровень повреждающего агента (холестерина),

а нарушение его взаимодействия со структурными компонентами сосудистой стенки (эндотелиальными, гладкомышечными клетками и лейкоцитами)

Наблюдаемое повышение уровня TNF α при увеличении общего ХС крови согласуется с результатами Г.Е. Ройтберг с соавт. (2010), которые определили положительные взаимосвязи между TNF α и гиперлипидемией крови [7]. Известно, что одним из эффектов TNF α является его способность ингибировать поглощение модифицированных ЛПНП макрофагами, в частности – инактивировать РНК скэвенджер – рецепторы класса А (СР), необходимые для захвата ЛПНП, и подавлять их экспрессию на клетках, что можно соотносить с противоатерогенным влиянием цитокина [7]. Установленная статистически значимая отрицательная корреляция между растворимыми рецепторами TNF α I и II типов и общим ХС, по нашему мнению, объясняется антагонизмом этих рецепторов со своим лигандом и, следовательно, разнонаправленным эффектом в отношении обмена ХС.

Увеличение уровня IL-2, тенденция к снижению его растворимого рецептора при повышении концентрации общего ХС (> 6,2 ммоль/л), указывает на контролирующее участие этого цитокина в обмене ХС. По данным литературы известно, что терапия рекомбинантным IL-2 способствует снижению ХС и липопротеинов [15]. Повышение системного содержания IL-17 у пациентов с высоким уровнем общего ХС в крови (> 6,2 ммоль/л) свидетельствует об активации Th17 и усилении нейтрофильного воспаления при гиперхолестеринемии.

Увеличение содержания TGF- β 1 при высоком уровне общего ХС крови можно также расценить как стимуляцию продукции цитокина при гиперхолестеринемии и косвенно соотносить с результатами экспериментального исследования Я.Ш. Шварц (2009), который при анализе среды культуры макрофагов, обогащенной ХС, выявил повышение продукции TGF- β 1 и стимуляцию фиброзозообразования [8]. Повышение системного уровня TGF- β может также приводить к усилению связывания ЛПНП сосудистой стенкой и к активации процессов атерогенного повреждения эндотелия [19, 23]. Установленное нарастание уровня IL-10 при увеличении концентрации общего ХС крови может свидетельствовать о реактивной стимуляции Т лимфоцитов при усилении действия повреждающего стимула (избытка холестерина, вторичной гиперпродукции TNF α) на эти и другие клетки – продуценты цитокина.

Высокие показатели MMP-9/TIMP-2 у пациентов с АС, по нашему мнению, могут отражать компенсаторное связывание желатиназы ее тканевым ингибитором 2 типа. Однако при этом известно, что увеличение уровня TIMP-2 способствует его связыванию с коллагенолитической протеиназой – MT1-MMP (MMP-14), что может усиливать желатинолитическую активность про-MMP-2 [13].

Прямая корреляция между IL-1 β и MMP-9 – ($r = 0,57$, $p = 0,01$) подтверждает данные М. Rohla, Т.W. Weiss (2013) об участии MMP-9 в активации IL-1 β [18,19] и согласуется с результатами М.Р. Alexander (2012) о том, что IL-1 β участвует в ремоделировании сосудистой стенки через MMP-зависимые механизмы [9]. Установленная прямая связь средней силы между IL-1 β и комплексом MMP-9/TIMP-1, вероятно, отражает активирующее влияние цитокина на связывание металлопротеиназы-9 – ее ингибитором (TIMP-1).

Отсутствие корреляции между IL-6, TNF α и MMP-9 не подтвердило их активирующее влияние на продукцию желатиназы [19]. Однако, зарегистрированная слабая связь между TNF α и TIMP-1 ($r = 0,21$, $p = 0,05$), указывает на компенсаторное повышение продукции ингибитора MMP-9 1 типа при увеличении продукции TNF α . Выявленные прямые корреляции IL-2 и IL-2R с TIMP-1 и с MMP-9/TIMP-1 при АС, также указывают на компенсаторную стимуляцию продукции TIMP-1, активацию его связывания с MMP-9 в ответ на опосредованное IL-2–IL-2R усиление лимфоцитарной инфильтрации и воспаления в стенке сосуда [2].

Установленная прямая слабая корреляция IL-17 и IL-10 с MMP-9/TIMP-1, возможно также отражает опосредованное интерлейкином-10 и 17 усиление связывания MMP-9 с ее ингибитором 1 типа.

Обнаруженная прямая слабая связь между MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-2 и уровнем общего ХС ($r = 0,42$, $r = 0,38$, $r = 0,24$, при $p < 0,05$) указывает на стимуляцию процессов деградации межклеточного матрикса под влиянием гиперхолестеринемии, что согласуется с данными литературы [19].

Таким образом, в ходе проведенного исследования уточнен функциональный дисбаланс про- и противовоспалительных механизмов иммунного реагирования при клинически выраженном течении атеросклеротического процесса. Выявлены взаиморегулирующие связи между цитокинами, уровнем общего ХС крови и маркерами деградации межклеточного матрикса в патогенезе ишемического повреждения и воспаления при атеросклерозе.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А. Цитокины. – СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. 552 с. [Ketlinskiy S.A. *Tsitokiny* [Cytokines]. St. Petersburg: Publishing House Foliant, 2008. 552 p.]
2. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2010. 272 с. [Lapin S.V., Totolyan A.A. *Immunologicheskaya laboratornaya diagnostika autoimmunnykh zabolevaniy* [Immunologic laboratory diagnostic of autoimmune diseases]. St. Petersburg: Human, 2010. 272 p.]
3. Лиходед В.Г., Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л. Рецепторная теория атеросклероза // Вестник Российской АМН. 2010. № 5. С. 11-25 [Likhoded V.G., Bondarenko V.M., Gintsburg A.L. Retseptornaya teoriya ateroskleroza [Receptor theory of atherosclerosis]. *Vestnik Rossiyskoy AMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, no. 5, pp. 11-25.]
4. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы. СПб.: Наука, 2001. 423 с. [Nazarov P.G. *Reaktanty ostroy fazy* [Reaktants of sharp phase]. St. Petersburg: Science, 2001. 423 p.]
5. Невзорова В.А., Шуматов В.Б., Натрадин О.В., Захарчук Н.В. Состояние функции сосудистого эндотелия у лиц с факторами риска и больных ишемической болезнью сердца // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 2. С. 37-41. [Nevzorova V.A., Shumatov V.B., Natradin O.V., Zakharchuk N.V. Sostoyanie funktsii sosudistogo endoteliya u lits s faktorami riska i bol'nykh ishemicheskoy bolezn'yu serdtsa [Functional condition of vascular endoteliy in persons with risk factors and in patients with coronary heart disease]. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2012, no. 2, pp. 37-41.]
6. Палеев Ф.Н., Абудеева И.С., Москалец О.В., Белокопытова И.С. Изменение интерлейкина-6 при различных формах ишемической болезни сердца // Кардиология. 2010. № 2. С. 69-72. [Paleev F.N., Abudeeva I.S., Moskalets O.V., Belokopytova I.S. Izmenenie interleukina-6 pri razlichnykh formakh ishemicheskoy bolezn'i serdtsa [Change of interleukin-6 at various forms coronary heart disease]. *Kardiologiya = Cardiology*, 2010, no. 2, pp. 69-72.]
7. Ройтберг Г.Е., Дорош Ж.В., Курушкина О.В. Метаболический синдром и распределение жировой ткани: точки соприкосновения и противоречивость взаимоотношений // Профилактическая медицина. 2010. № 1. С. 22-25. [Roytberg G.E., Dorosh Zh.V., Kurushkina O.V. Metabolicheskii sindrom i raspredelenie zhirovoy tkani: tochki soprikosnoveniya i protivorechivost' vzaimootnosheniy [Metabolic syndrome and distribution of fatty tissue: common point and discrepancy of relationship]. *Profilakticheskaya meditsina = Preventive Medicine*, 2010, no. 1, pp. 22-25.]
8. Шварц Я.Ш., Хощенко О.М., Душкин М.И., Феофанова Н.А. Действие холестерина и агонистов гормональных ядерных рецепторов на продукцию трансформирующего фактора роста-β в макрофагах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 148, № 9. С. 294-297. [Shvarts Ya.Sh., Hoshchenko O.M., Dushkin M.I., Feofanova N.A. Deystvie kholesterina i agonistov gormonal'nykh yadernykh retseptorov na produktsiyu transformiruyushchego faktora rosta-β v makrofagakh [Effect of cholesterol and agonist of hormonal nuclear receptors on production of a transforming growth factor β in macrophages]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, Vol. 148, no. 9, pp. 294-297.]
9. Alexander M.R., Moehle C.W. Genetic in activation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque in stability and reduces out ward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J.F. Clinical Investigation*, 2012, Vol. 122, no. 1, pp. 70-79.
10. Chen S., Shimada K., Zhang W., Huang G., Crother T.R., Arditi M. IL-17A is proatherogenic in high-fat diet-induced and Chlamydia pneumoniae infection-accelerated atherosclerosis in mice. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 9, pp. 5619-5627.
11. Delles C., Dymott J.A., Neisius U., Rocchiccioli J.P., Bryce G.J., Moreno M.U., Carty D.M., Berg G.A., Hamilton C.A., Dominiczak A.F. Reduced LDL-cholesterol levels in patients with coronary artery disease are paralleled by improved endothelial function: An observational study in patients from 2003 and 2007. *Atherosclerosis*, 2010, Vol. 211, pp. 271-277.
12. Duerrschmid C., Crawford J.R., Reineke E., Taffet G.E. TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin-II-induced cardiac fibrosis. *J. of Molecular and Cellular Cardiology*, 2013, Vol. 57, pp. 59-67.
13. Hagemann C., Anacker J., Ernestus R.I., G.H. Vince Complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J. Clin. Oncol*, 2012, Vol. 10:3, no. 5, pp. 67-79.

14. Holifield, J.S., Arlen A.M., Runyan R. TGF- β 1, - β 2 and - β 3 Cooperate to Facilitate Tubulogenesis in the Explanted Quail Heart. *J. Vasc. Res.*, 2004, Vol. 41, pp. 491-498.
15. Kwong L.K., Ridinger D.N., Bandhauer M., Ward J.H., Samlowski W.E., Iverius P.H., Pritchard H., Wilson D.E. Acute dyslipoproteinemia induced by interleukin-2: lecithin: cholesteryl acyl transferase, lipoprotein lipase, and hepatic lipase deficiencies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, Vol. 82, no. 5, pp. 1572-1581.
16. Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011, Vol. 473, pp. 317-325.
17. Ouyang W., Kolls J.K., Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 2008, Vol. 28, pp. 454-467.
18. Ridker P.M., Danielson E., Fonseca F.A. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.*, 2008, Vol. 359, no. 21, pp. 2195-2207.
19. Rohla, M., Weiss, T. W. Metabolic syndrome, inflammation and atherothrombosis. *Hamostaseologie*, 2013, Vol. 33, no. 4, pp. 283-294.
20. Saremi A., Anderson R. J., Luo P., Moritz T.E., Schwenke D.C, Allison M., Reaven P.D.; VADT Association Between IL-6 and the extent of Coronary Atherosclerosis in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Atherosclerosis*, 2009, Vol. 203, no. 2, pp. 610-614.
21. Schuett H., Luchtefeld M., Grothusen C., Grote K., Schieffer B. How much is too much. Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 102, pp. 215-222.
22. Wang Z., Lee J., Zhang Y. Increased Th17 cells in coronary artery disease are associated with neutrophilic inflammation. *Scand. Cardiovasc. J.*, 2011, Vol. 45, pp. 54-61.
23. Yang S.N., Burch M.L., Tannock L.R., Evanko S., N., Osman P.J., Little P.J. Transforming growth factor- β regulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle: contribution to lipid binding and decelerated atherosclerosis in diabetes. *Little Journal of Diabetes*, 2010, no. 2, pp. 233-242.

Meditsinskaya Immunologiya / Medical Immunology
2014, Vol. 16, No 4, pp. 323-332

ORIGINAL ARTICLES

FEATURES OF CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

Turmova E.P.^a, Markelova E.V.^a, Silayev A.A.^b, Lukyanov P.A.^c, Chikalovets I.V.^c

^a Pacific Medical University, Russian Ministry of Health Care, Vladivostok, Russian Federation

^b Medical Center of the Far East Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^c G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Our study included measuring the following biological substances: cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF α , IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, IL-2, IL-17); soluble receptors to cytokines (IL-2R, IL-6R, TNF α RI and TNF α RII); total serum cholesterol; indicators of intercellular matrix degradation (metalloproteinases-9; tissular inhibitor of MMP-9 1 type (TIMP-1); MMP-9/TIMP 1 and MMP-9/TIMP 2 complexes) in 260 patients with clinically manifestations of coronary and lower limb atherosclerosis. Among the patients with atherosclerosis, we have found increased average levels of IL-6, TGF- β 2, TNF α RI, TNF α RII, IL-2R, along with decreased IL-2 and IL-10 concentrations, increase of MMP-9/TIMP-2 ratio in blood serum. The following direct correlations were revealed between MMP-9 and IL-1 β ; between MMP-9/TIMP-1 complex and IL-1 β , IL-2, IL-2R, IL-17, IL-10; TIMP-1 with TNF α , IL-2 and IL-2R. At high levels of the general cholesterol, an increased production of TNF α , IL-17, TGF- β 1, IL-2, IL-10, MMP-9, TIMP-1 was detected, as well as decreased amounts of TNF α I and TNF α II soluble receptors in blood serum of these patients. Direct correlations were established between total blood cholesterol levels and IL-2, IFN γ , MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-2. However blood cholesterol levels showed reverse correlations with TNF α RI, and TNF α RII. In the course of this study, we have specified a functional imbalance between pro- and anti-inflammatory mechanisms of immune reaction in clinically expressed atherosclerosis. Significant regulatory interactions have been revealed between cytokine levels, total blood cholesterol and markers of intercellular matrix degradation. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 4, pp 323-332)

Keywords: atherosclerosis, immune system, hyperlipidemia, cytokines, metalloproteinases

Authors:

Turmova E.P., PhD (Medicine), Teaching Assistant, Human Physiology Department, Pacific Medical University, Russian Ministry of Health Care, Vladivostok, Russian Federation

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Human Physiology Department, Pacific Medical University, Russian Ministry of Health Care, Vladivostok, Russian Federation

Silayev A.A., PhD (Medicine), Clinical Anesthesiologist, Chief, Reanimatology Department, Medical Center of the Far East Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Lukyanov P.A., PhD, MD (Chemistry), Professor, Principal Research Associate, Laboratory of Non-infectious Immunity Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Chikalovets I.V., PhD (Chemistry), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Non-infectious Immunity Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Address for correspondence:

Turmova Ekaterina P.

PhD, Teaching Assistant, Chair of Human Physiology, Pacific Medical University, Russian Ministry of Health Care 690002, Russian Federation, Primorye territory, Vladivostok, Ostryakova av., 2.

Phone/fax: 7 (423) 245-07-00.

E-mail: eturmova@mail.ru, patphis-vl@mail.ru

Received 18.04.2014

Revision received 20.04.2014

Accepted 30.04.2014