

На правах рукописи

ФИЛАТОВА АНАСТАСИЯ ЮРЬЕВНА

**ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ: ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ И ВЛИЯНИЕ
ТЕРАПИИ СТАТИНАМИ**

14.01.05 – Кардиология

14.03.10 – Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва, 2022

Работа выполнена в отделе легочной гипертензии и заболеваний сердца НИИ клинической кардиологии имени А.Л. Мясникова и лаборатории клеточной иммунологии НИИ экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук
Доктор биологических наук

Проваторов Сергей Ильич
Арефьева Татьяна Игоревна

Официальные оппоненты:

Гиляров Михаил Юрьевич – Доктор медицинских наук, доцент, заместитель главного врача по терапевтической помощи ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница №1 им. Н.И. Пирогова Департамента здравоохранения г. Москвы».

Андреев Елена Юрьевна – Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела клинической кардиологии ФГБУ «НМИЦ терапии и профилактической медицины» Минздрава России.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук в НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России по адресу: 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ НМИЦ «кардиологии» Минздрава России и на сайте <http://cardioweb.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.м.н.

Ускач Татьяна Марковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Хронический воспалительный процесс с вовлечением иммунных клеток занимает центральное место в патогенезе атеросклероза (АС) – наиболее распространенного возраст-ассоциированного заболевания магистральных артерий [Saigusa R; 2020]. Исследование субпопуляционного состава циркулирующих моноцитов и лимфоцитов при АС проводилось ранее [Gayoso I; 2011, Liu Z; 2012, Klingenberg R; 2013, Potekhina A; 2015, Del Porto F; 2017, Höpfner F; 2019], однако полученные результаты противоречивы. Принято считать, что неоднородность артерий по гистологическим характеристикам и параметрам гемодинамики обуславливает разную скорость развития АС, при этом вклад иммунологической составляющей в патогенез АС различной локализации не изучался. Единичные исследования посвящены оценке прогностической значимости иммунных показателей в выявлении лиц, склонных к быстрому прогрессированию АС [Wigren M; 2012, Kasahara T; 2014]. Установлено, что возрастные изменения иммунной системы способствуют поддержанию т.н. системного воспаления низкой интенсивности, характерному в целом для возраст-ассоциированных хронических заболеваний [Miosecc P; 2009, Pan X; 2012, Greque G; 2016, Votafogo V; 2020]. Данных об особенностях субпопуляционного состава циркулирующих Т-лимфоцитов и моноцитов у пациентов с АС разного возраста не опубликовано.

Статины являются основным классом лекарственных препаратов, применяемых для коррекции липидного профиля у пациентов с АС. Показано, что статины обладают противовоспалительной активностью [Bedi O; 2016]. В ряде клинических работ изучалось влияние статинов на показатели клеточного иммунитета [Peng D; 2008, Zhang M; 2011, Rodriguez-Perea A; 2015, Кузнецова Г; 2016], однако в связи с несопоставимостью обследуемых групп больных и различиями в схемах приема препаратов необходимо продолжение исследований в этой области. Большинство экспериментальных работ по изучению механизмов действия статинов на иммунологические параметры проводилось при использовании «нефизиологических» концентраций препаратов [Bjorkhem-Bergman L; 2011].

Изучение про- и антиатерогенного потенциала иммунных клеток и иммуотропного действия статинов позволит разработать новые методы диагностики и

лечения пациентов с АС, учитывающие особенности иммунного статуса конкретного больного.

Цель исследования: исследовать взаимосвязь показателей клеточного иммунитета с выраженностью и скоростью прогрессирования атеросклеротического поражения сонных артерий, оценить влияние терапии статинами на субпопуляционный состав лимфоцитов и моноцитов крови у пациентов с атеросклерозом, оценить эффекты статинов в культуре лейкоцитов человека.

Задачи исследования:

1. Оценить взаимосвязь содержания субпопуляций лимфоцитов (хелперные Т-лимфоциты, Т-хелперы(Тх)1, Тх17, активированные Т-хелперы (Тх-акт), регуляторные Т-лимфоциты (Трег)) в крови с локализацией и выраженностью атеросклеротического поражения сонных артерий по данным ультразвукового дуплексного сканирования (УЗДС) (дистальные сегменты общей сонной артерии (ОСА), бифуркации ОСА, внутренней сонной артерии (ВСА)).
2. Проанализировать взаимосвязь исходного содержания в крови субпопуляций лимфоцитов (количество Т-, В-, НК-клеток, цитотоксических Т-клеток, хелперных Т-лимфоцитов, Тх1 и Тх2, Тх17, активированных Т-хелперов, Трег) с прогрессированием атеросклероза сонных артерий в течение 1 года по данным УЗДС.
3. Провести сравнительный анализ влияния терапии различными дозами розувастатина и аторвастатина на субпопуляционный состав лимфоцитов (количество Т-, В-, НК-клеток, цитотоксических Т-клеток, хелперных Т-лимфоцитов, Тх1 и Тх2, Тх17, активированных Т-хелперов, Трег), фенотип Трег, состав моноцитов (классических, промежуточных и неклассических) периферической крови у пациентов с различной выраженностью атеросклероза коронарных артерий.
4. Изучить эффекты розувастатина и аторвастатина на продукцию цитокинов моноцитами/макрофагами здоровых доноров, пролиферацию, апоптоз и миграционную активность Т-лимфоцитов *in vitro*.
5. Проанализировать содержание эффекторных и регуляторных субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов и популяций моноцитов в крови у пациентов с атеросклерозом в зависимости от возраста.

Научная новизна. Впервые изучена взаимосвязь показателей клеточного иммунитета с локализацией и выраженностью атеросклеротического поражения сонных

артерий, прогрессирующим каротидным атеросклерозом. Впервые получены подтверждения того, что вклад иммуновоспалительных механизмов в развитие атеросклероза может зависеть от возраста пациента. Получены оригинальные данные об особенностях влияния розувастатина и аторвастатина на иммунный статус человека; в исследованиях *in vitro* получены новые данные о влиянии изучаемых статинов на способность моноцитов и лимфоцитов к осуществлению эффекторных функций; в отличие от предыдущих исследований, статины были использованы в концентрациях, соответствующих таковым в крови пациентов.

Практическая значимость. Результаты работы позволяют утверждать о существовании возраст-ассоциированных механизмов атерогенеза, выделять категории больных с высокой вероятностью прогрессии атеросклероза; определяют потенциал системного иммуномодулирующего и противовоспалительного действия статинов. Полученные данные инициируют исследования по разработке новых диагностических методов и персонализированных подходов к лечению пациентов с АС, включая больных с сопутствующими воспалительными заболеваниями.

Положения, выносимые на защиту:

1. Повышенное содержание Тх17 в крови ассоциируется с выраженностью атеросклероза ВСА.
2. Повышенное содержание в кровотоке CD4+ Т-лимфоцитов и Тх17 и сниженное соотношение Трег/Тх17 с высокой чувствительностью и специфичностью свидетельствует о высоком риске прогрессирования АС сонных артерий в течение 1 года у пациентов с содержанием холестерина (ХС) липопротеидов низкой плотности (ЛНП) крови менее 3,5 ммоль/л.
3. Терапия аторвастатином, но не розувастатином, ассоциируется с возрастанием относительного содержания в крови Трег, увеличением соотношения Трег/Тх17 и уменьшением соотношения Тх-акт/Трег.
4. Аторвастатин и розувастатин дозозависимо подавляют миграцию и пролиферацию эффекторных CD4+ лимфоцитов *in vitro*, приводя к увеличению относительного содержания Трег. Статины подавляют дифференцировку выделенных из крови моноцитов в макрофаги, снижают способность макрофагов к активации, ингибируя на посттранскрипционном уровне продукцию цитокинов. По сравнению с розувастатином, клеточные эффекты аторвастатина проявляются при более низких концентрациях.

5. У пациентов с АС коронарных артерий наблюдается снижение с возрастом количества циркулирующих Трег на фоне неизменного уровня эффекторных Т-лимфоцитов, преимущественно вследствие сужения популяции наивных клеток. Общее количество моноцитов и количество классических моноцитов ниже у больных с АС, а количество промежуточных моноцитов выше, по сравнению с группой без АС. Содержание классических моноцитов ниже у пациентов с наиболее тяжелым поражением коронарного русла. У более молодых пациентов в крови преобладают промежуточные моноциты, в то время как у пациентов старшей возрастной группы отмечается снижение содержания классических моноцитов, приводящее к увеличению относительного количества неклассических форм.

Внедрение результатов в практику. Результаты исследования внедрены в научную и практическую работу отдела легочной гипертензии и заболеваний сердца НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова и лаборатории клеточной иммунологии НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов диссертации основана на включении достаточного количества пациентов, использовании адекватных клинических и экспериментальных методов и подходов, применении стандартных статистических тестов. Апробация диссертации состоялась на межотделенческой научной конференции НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России 2 сентября 2021 года (протокол №82). Диссертация рекомендована к защите.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 40 печатных работ, из них 9 статей, рекомендованных ВАК, и 25 тезисов. Материалы работы представлены на конгрессах EAS (2016,2017,2019,2021), ESC Preventive Cardiology (2020,2021), SSAR (2016), FEBS (2021), ECI (2021), Российский национальный конгресс кардиологов (2018,2020), Российские дни сердца (2018), Спорные и нерешенные вопросы кардиологии (2019,2020), Всероссийской научно-практической конференции и 55-й ежегодной сессии РКНПК «Достижения современной кардиологии» (2015), 56-й ежегодной сессии РКНПК «Кардиология 2016: итоги и перспективы» (2016), 57-й ежегодной сессии РКНПК (2017), 58-й сессии НМИЦ кардиологии «Новые вызовы и новые решения в кардиологии» (2018), 59-й сессии НМИЦ кардиологии «Современная

кардиология: базовые принципы и прогресс» (2019), 60-й сессии НМИЦ кардиологии «Кардиология на марше 2020» (2020), 61-й сессии НМИЦ кардиологии «Кардиология на марше 2021», XIII ежегодной научно-практической конференции НОА «Пандемия атеросклероза» (2020), Форуме молодых кардиологов (2021).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах, содержит 23 таблицы и 23 рисунка, 3 клинических примера, состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы (352 источника).

Личный вклад автора. Автором работы проводился анализ литературы, посвященной изучаемой проблеме, разработка концепции исследования, отбор пациентов для включения в исследование и их ведение в течение стационарной госпитализации и последующих амбулаторных визитов. Автором проводилось выделение из крови и культивирование лейкоцитов, иммунофенотипирование клеток. Автором осуществлены статистическая обработка результатов, написание статей и тезисов, подготовка текста диссертации, разработка практических рекомендаций.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В исследование включено 220 пациентов, проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» на предмет наличия и оценки выраженности коронарного и/или сонного АС, а также 20 здоровых доноров в возрасте 25-40 лет. В группу изучения взаимосвязи показателей клеточного иммунитета с выраженностью АС различных сегментов сонных артерий включали мужчин в возрасте 40-75 лет с документированным по данным УЗДС каротидным атеросклерозом (наличие АСБ в ОСА, бифуркации ОСА и ВСА, суживающей просвет сосуда не менее 20%). В проспективное исследование связи иммунных показателей со скоростью прогрессирования АС включали мужчин в возрасте 40-67 лет с АС сонных артерий, которым УЗДС экстракраниального отдела сонных артерий проводилось дважды, исходно и через 11-13 месяцев. В группу изучения динамики показателей клеточного иммунитета на фоне терапии статинами включались мужчины и женщины в возрасте 40-75 лет с наличием АС коронарных и/или сонных артерий (стенозирование коронарных артерий $\geq 30\%$, стенозирование сосудов БЦА не менее 20%), не достигших целевых уровней ХС ЛНП на фоне принимаемой дозы статинов и имеющих показания к интенсификации терапии

статины. Для анализа возрастных особенностей показателей клеточного иммунитета включались мужчины и женщины в возрасте 40-80 лет, имеющих показания к проведению коронароангиографии (КАГ) и УЗДС БЦА. Все пациенты подписали письменное информированное согласие пациента на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ (№249 от 30.09.2019г.). Всем пациентам проводилось общеклиническое обследование, электрокардиография (ЭКГ) в 12 стандартных отведениях, суточное мониторирование ЭКГ, эхокардиография, общий и биохимический анализ крови; УЗДС экстракраниального отдела БЦА и КАГ по показаниям.

Выделение мононуклеарных клеток из крови в цитратном антикоагулянте проводили методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин ($\rho=1.077$). CD4⁺ Т-клетки и CD14⁺ моноциты выделяли методом иммуномагнитной сепарации (Miltenyi Biotec, Германия).

Имунофенотипирование лимфоцитов и моноцитов крови. Для выявления поверхностных антигенов использовали флуоресцентно-меченные моноклональные антитела к CD3, CD4, CD45, CD(16+56), CD19, CD127, CD25, CD8, CD14, CD16 (BD Immunocytometry Systems, eBioscience, BeckmanCoulter). Окрашивание поверхностных антигенов проводили в цитратной крови с использованием растворов для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов (BD Immunocytometry Systems) и в культуре мононуклеарных лейкоцитов. Для идентификации внутриклеточных белков использовали наборы для фиксации и пермеабиллизации клеток и флуоресцентно-меченные антитела к FoxP3, IL17A, IL-10 и INF γ (eBioscience); окрашивание клеток антителами проводили в культуре мононуклеарных лейкоцитов после активации в присутствии форболмиристатацетата, иономицина и брефельдина А. Все процедуры проводили в соответствии с протоколами производителей. Флюоресценцию клеток измеряли методом цитофлуориметрии в потоке с помощью программного обеспечения CellQuestPro (FACS Calibur, BD Immunocytometry Systems). Лимфоциты выделяли по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Определяли количество CD3⁺ Т-клеток, включая популяции CD4⁺ хелперных и CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов, В-клеток (CD19⁺), NK (CD3-(16+56)⁺). Активированные Т-хелперные клетки (Тх-акт) типировали как CD4⁺CD25^{low}CD127^{high}; Трег как CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} и CD4⁺Foxp3⁺ Т-лимфоциты; ИЛ-10 продуцирующие Т-лимфоциты как CD4⁺IL10⁺. Тх1,

Tx2, Tx17 и Tx1/17 как CD4+IFN γ +, CD4+IL4+ и CD4+IL17+ и CD4+IL17+IFN γ +, соответственно. Идентифицировали классические (CD14++CD16-), промежуточные (CD14++CD16+) и неклассические (CD14+CD16++) моноциты.

Пролиферацию лимфоцитов оценивали по исключению витального флуоресцентного красителя CFSE (eBioscience) после культивирования в бессывороточной среде X-vivo 15, содержащей фитогемагглютинин (ФГА, Sigma) и рекомбинантный интерлейкин (ИЛ)-2 человека (R&D Systems). Аторвастатин (Sigma-Aldrich) и розувастатин (Acros organics) добавляли в концентрации 10-100 нМ. Флуоресценцию CFSE анализировали через 72 ч на проточном цитофлуориметре. Для оценки механизма действия статинов в культуру дополнительно вносили мевалонат (5 мкМ, Sigma-Aldrich).

Оценка миграции лимфоцитов. CD4+ Т-лимфоциты высаживали в культуру в бессывороточной среде с добавлением ИЛ-2 и статинов (по 20 нМ) на 72-96ч ч. Миграционную способность клеток анализировали в системе TransWell с диаметром пор 5 мкм для 24-луночных планшетов (Corning, NY) в течение 2ч. В качестве хемоаттрактанта использовали хемокин SDF-1 (R&D Systems). Результаты выражали в отн.ед., принимая за «1» количество промигрировавших «контрольных» (не обработанных статинами) клеток.

Индукция макрофагальной дифференцировки моноцитов крови. CD14+ клетки высаживали в культуральные планшеты в среде X-vivo 15 с добавлением рекомбинантного гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) (R&D Systems; статины вносили в концентрации 2 и 10 нМ. Через 3 дня клетки активировали липополисахаридом (ЛПС) (Sigma) и интерфероном(ИНФ) γ (Ингарон, НПП Фармаклон) в течение 20 часов (классическая активация макрофагов по фенотипу M1).

Концентрацию цитокинов (ИЛ-1 β , -6, -10, -12, ФНО) в супернатантах культур макрофагов анализировали методом проточной цитометрии с помощью коммерческих наборов BD CBA Flex Set (BD Bioscience) или методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора BD OptEIA (BD Pharmingen), в соответствии с протоколами производителей.

Определение уровня мРНК цитокинов в макрофагах. Суммарная РНК была выделена набором RNeasy Mini Kit (QIAGEN), кДНК получена с использованием набора

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) с использованием готовой реакционной смеси, содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green (Syntol).

Активность внутриклеточных сигнальных каскадов в активированных CD4+ лимфоцитах и M1-макрофагах оценивали по степени фосфорилирования внутриклеточных протеинкиназ, используя флуоресцентно-меченные антитела к phospho-Akt (pS473, pT308), phospho-ERK-1/2 (pT202/ pY204), антитела к нефосфорилированным молекулам, реагенты для фиксации, пермеабиллизации и окрашивания клеток (наборы Phosflow, BD Biosciences). Связывание антител с протеинкиназами анализировали на проточном цитофлуориметре.

Оценка апоптоза проводилась по окрашиванию клеток антителами к активной каспазе-3 (набор PE Active Caspase Apoptosis Kit (BD Pharmingen) по протоколу производителя. Флуоресценцию клеток оценивали методом проточной цитометрии.

Оценка экспрессии дифференцировочных антигенов и рецепторов хемокинов лимфоцитами и макрофагами. Содержание Трег в культуре CD4+ лимфоцитов оценивали по окрашиванию флуоресцентно-мечеными антителами к Foxp3 (eBioscience). Степень активации/дифференцировки макрофагов оценивали по уровню экспозиции молекул CD11c, CD80, CD86, CD83, HLA-DR, CD282 (TLR2), CD284 (TLR4), используя прямую иммунофлуоресценцию (антитела производства eBioscience, BectonDickinson Immunocytometry Systems, Beckman Coulter). Для оценки экспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR5, CXCR3, CXCR4 лимфоциты инкубировали с соответствующими флуоресцентно-мечеными антителами (R&D Systems). Связывание антител с клетками оценивали методом проточной цитометрии.

Статистический анализ данных. Данные представлены как медиана (25й-75й перцентили) в связи с их несоответствием параметрам нормального распределения. Для множественного межгруппового сравнения использовали тест медиан и критерий Краскала-Уоллиса, для попарных межгрупповых сравнений - U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения показателей в малых выборках в динамике использовали непараметрический парный тест Уилкоксона для зависимых выборок. Для сопоставления групп по качественным признакам (пол, распространённость артериальной гипертензии, статус курения, инфаркта миокарда в анамнезе)

использовали критерий Хи-квадрат, в случае малых групп – Хи-квадрат с поправкой Йетса. Корреляционный анализ проводили с использованием метода Спирмена. Анализ чувствительности метода проводился при помощи построения ROC-кривых с использованием программного обеспечения PRISM. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. В работе применялся пакет статистических программ Statistica 10,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взаимосвязь показателей клеточного иммунитета крови с локализацией и выраженностью атеросклероза сонных артерий

В исследование было включено 70 мужчин. Все пациенты принимали статины не менее одного месяца перед включением в исследование. Для каждой локализации атеросклеротического поражения (дистальные сегменты ОСА, бифуркация ОСА, ВСА) были определены 4 степени выраженности стенозирования: 20-25%, 25<%≤35%, 35<%≤50% и более 50%. Частота артериальной гипертензии была выше у пациентов со стенозом ОСА 25<%≤35% и 35<%≤50%, по сравнению с пациентами с начальным поражением ОСА, по остальным клинико-лабораторным показателям группы были сопоставимы.



Рисунок 1. Содержание Тх17 (% от лимфоцитов) у пациентов с различной степенью атеросклеротического поражения в зависимости от локализации поражения БЦА.

Относительное содержание Тх17 в крови было выше у больных со стенозами ВСА >35% и >50% по сравнению с пациентами со стенозами ВСА 35% и менее ($p < 0,05$) (рисунок 1). Относительное содержание Тх17 (% от лимфоцитов) $\geq 0,55$ ассоциировалось с более выраженным стенозированием ВСА: отношение шансов (ОШ) для пациентов со стенозом 35<%≤50% составило 4,3 (1,0-17,6), $p = 0,04$, ОШ для пациентов со стенозом

>50% составило 6,8 (1,3-35,0), $p=0,02$. По содержанию Трег, Тх-акт, Тх1 и CD4+IL17+INF γ + Т-клеток различий не обнаружено.

Группы пациентов с различной степенью поражения ОСА и бифуркации ОСА не различались ни по одному из анализируемых иммунологических показателей.

Сопоставление групп больных с прогрессированием и без прогрессирования атеросклероза сонных артерий

Критерием прогрессирования каротидного АС считали появление нового стеноза в ОСА и ВСА или увеличение степени стеноза на 5% и более. Из 45 включенных пациентов 12 выбыли из исследования в связи с необходимостью изменения терапии (показания к назначению терапии статинами). Из 33 пациентов, завершивших исследование, у 16 отмечено прогрессирование АС сонных артерий, у 17 пациентов не выявлено признаков прогрессирования АС сонных артерий.

Группы пациентов с и без прогрессирования АС были сопоставимы по основным клиническим характеристикам и лабораторным показателям. По исходному содержанию основных (CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т-, В-, НК) и некоторых минорных (Трег CD4+CD25^{high}CD127^{low} и CD4+Foxp3+, Тх1, Тх1/17 и Тх2) популяций лимфоцитов, а также по составу моноцитов крови группы не различались. В группе больных с прогрессированием АС сонных артерий выявлено исходно более высокое содержание Тх17 и низкое соотношение Трег/Тх17.

Таблица 1 - Субпопуляции лимфоцитов у пациентов с и без прогрессирования АС сонных артерий и уровнем ХС ЛНП менее 3,5 ммоль/л

Параметр	Пациенты (n=17)		p
	Без прогрессирования (n=8)	С прогрессированием (n=9)	
Лейкоциты, млн/мл	7,5 (6,5;8,3)	7,5 (7,1;8,5)	0,66
Лимфоциты (% от лейкоцитов)	28,5 (26,0;30,5)	26,0 (23,0;30,0)	0,77
CD4+ (% от лимфоцитов)	38,0 (30,5;40,0)	42,0 (42,0;48,5)	0,007
CD4+CD25 ^{low} CD127 ^{high}	17,0 (11,3;21,2)	23,2 (19,8;24,2)	0,01
Тх-акт (% от лимфоцитов)			
Тх17 (% от лимфоцитов)	0,4 (0,3;0,5)	0,8 (0,5;1,7)	0,01
Тх17 (1000/мл)	7,4 (4,7;12,3)	18,2 (9,9;23,9)	0,04
CD4+CD25 ^{high} CD127 ^{low}	6,3 (4,3;8,1)	3,0 (1,8;4,0)	0,03
Трег/Тх17			
CD4+Foxp3+ Трег/Тх17	8,8 (4,8;10,9)	2,5 (2,4;4,2)	0,03

Данные представлены как медиана и интерквартильный размах. * - $p<0,05$ по сравнению с исходным значением показателя.

Обнаруженные взаимосвязи между субпопуляционным составом лимфоцитов и прогрессированием АС сонных артерий оказались характерны исключительно для больных с уровнем ХС ЛНП в крови менее медианы 3,5 ммоль/л (таблица 1). У таких лиц с прогрессированием АС ассоциировались значимо большие значения содержания CD4+ лимфоцитов, Tх-акт, Tх17 и меньшие значения отношений CD4+CD25highCD127low Трег/Tх17 и CD4+Foxp3+ Трег/Tх17 по сравнению с лицами без прогрессирования заболевания.

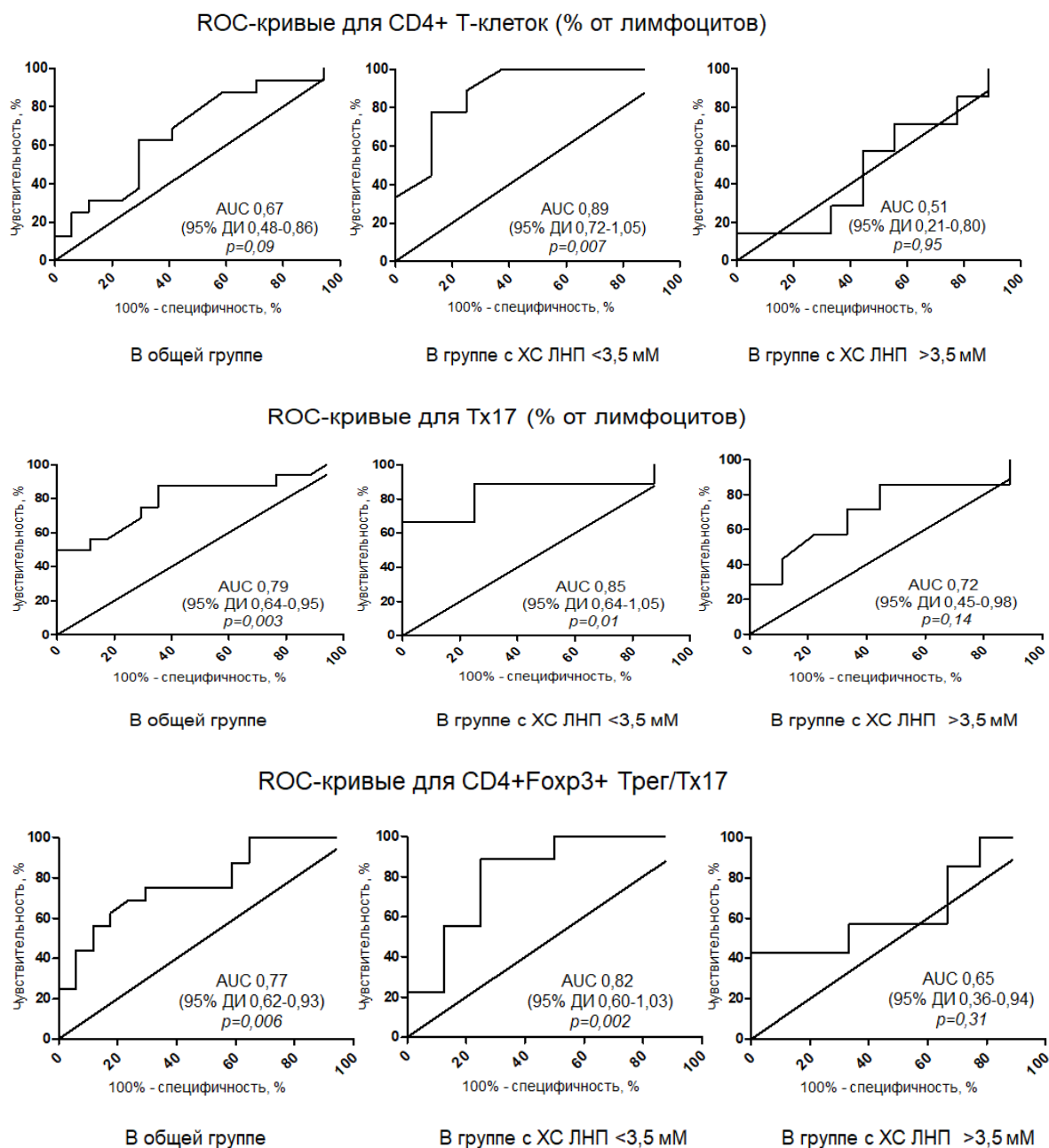


Рисунок 2. ROC-кривые для определения диагностической значимости содержания CD4+ клеток, Tх17, CD4+Foxp3+ Трег/Tх17 в отношении прогрессии АС сонных артерий в общей группе больных и у больных с уровнями ХС ЛНП менее 3,5 ммоль/л. AUC – площадь под ROC-кривой, 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

Таблица 2 – Клинико-лабораторные и иммунологические показатели пациентов, принимавших аторвастатин и розувастатин, исходно и через 1 месяц.

Показатель	Группа «Аторвастатин»		Группа «Розувастатин»	
	исходно	Через 1 мес	исходно	Через 1 мес
Лейкоциты, млн/мл	6,9 (5,3;8,0)	7,5 (5,0;8,0)	6,4 (5,2;7,0)	6,2 (5,0;6,8)
Глюкоза, ммоль/л	5,6 (5,3;5,6)	5,6 (5,0;5,8)	5,5 (4,9;6,4)	5,3 (5,2;6,2)
Общий ХС, ммоль/л	5,3 (3,9;6,2)	3,9 (3,4;4,6)*	4,5 (4,0;6,9)	3,9 (3,2;4,8)*
ХС ЛВП, ммоль/л	1,0 (0,9;1,3)	1,0 (0,9;1,3)	1,1 (0,9;1,3)	1,1 (1,0;1,4)
ХС ЛНП, ммоль/л	3,7 (2,1;4,4)	2,4 (1,8;3,1)*	3,2 (2,4;4,8)	2,0 (1,7;2,6)*
ТГ, ммоль/л	1,2 (0,9;1,9)	0,9 (0,7;1,3)*	1,2 (0,9;1,7)	0,9 (0,7;1,4)
Лимфоциты (%)	26,0 (23,0;33,0)	25,0 (22,5;28,0)	32,0 (28,0;35,0)	29,0 (26,0;35,0)
CD3+ Т-лимфоциты (% от лимфоцитов)	71,0 (68,0;73,0)	69,0 (66,0;73,0)	71,0 (63,0;76,0)	70,5 (65,0;75,5)
CD4+ Т-лимфоциты (% от лимфоцитов)	46,0 (43,0;48,0)	45,5 (40,0;48,0)	43,0 (35,5;45,0)	40,5 (33,0;50,0)
Тх-акт (% от CD4+ клеток)	54,6 (47,7;58,0)	55,1 (43,9;58,6)	53,1 (45,9;56,2)	55,0 (46,5;58,0)
CD4+CD25high CD127low Трег (% от CD4+ клеток)	5,4 (4,6;6,5)	6,5 (4,8;8,2)*	5,8 (4,7;6,5)	4,8 (4,1;5,9)
CD4+Foxp3+ Трег (% от CD4+ клеток)	9,9 (7,3;10,3)	9,4 (7,5;11,8)	6,9 (6,0;8,6)	8,0 (6,4;8,7)
Тх1 (% от CD4+ клеток)	20,8 (14,0;28,6)	18,4 (14,0;26,5)	21,3 (18,5;26,6)	20,3 (14,8;26,9)
Тх2 (% от CD4+ клеток)	2,5 (1,9;3,6)	2,1 (1,1;2,6)	2,6 (2,1;3,3)	2,4 (1,3;2,8)
Тх17 (% от CD4+ клеток)	1,7 (0,9;3,1)	1,4 (0,9;2,0)	1,3 (0,8;1,9)	1,5 (1,1;2,1)
Тх-акт/ CD4+CD25high CD127low Трег	9,6 (7,2;12,5)	8,7 (6,1;10,7)*	9,1 (8,2;10,4)	10,4 (8,7;11,7)
CD4+Foxp3+ Трег/Тх17	4,4 (2,8;8,8)	6,8 (4,4;11,5)*	5,1 (3,4;8,6)	6,2 (3,7;8,3)
CD3+CD8+ Т-клетки (% от лимфоцитов)	23,0 (18,5;30,5)	22,5 (20,0;26,0)	27,0 (23,0;30,0)	27,0 (24,5;30,0)
В-клетки (% от лимфоцитов)	10,0 (8,0;12,0)	9,0 (7,0;12,0)	8,0 (6,6;11,0)	8,0 (5,5;11,0)
НК-клетки (% от лимфоцитов)	19,0 (17,8;23,0)	19,8 (17,0;24,5)	20,6 (14,5;28,0)	21,0 (16,0;24,3)
Моноциты (%)	6,0 (5,0;8,0)	7,0 (5,0;8,0)	7,0 (6,0;9,0)	7,0 (6,0;8,0)
Неклассические (% от моноцитов)	14,8 (11,8;19,3)	16,6 (13,7;19,8)	14,8 (11,3;20,0)	15,7 (13,5;19,5)
Промежуточные (% моноцитов)	9,2 (5,0;11,5)	9,3 (6,0;15,3)	9,9 (6,8;12,4)	8,1 (6,5;10,0)
Классические (% от моноцитов)	75,7 (68,0;81,2)	74,6 (65,2;80,6)	72,9 (65,0;78,7)	75,2 (71,3;79,7)

Данные представлены как медиана и интерквартильный размах. * - $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением показателя.

Наибольшей чувствительностью и специфичностью в отношении прогрессии АС сонных артерий среди исследованных клеточных субпопуляций обладали значения содержания CD4⁺ клеток, Tх17 и отношение Трег/Tх17 (рисунок 2).

Влияние терапии аторвастатином и розувастатином на показатели клеточного иммунитета в динамике

35 пациентов были рандомизированы в 2 группы: увеличение дозы аторвастатина с 20 до 80 мг/сут (n=18) или розувастатина с 10 до 40 мг/сут (n=17) в течение 1 мес. Сопутствующая терапия не изменялась в обеих группах пациентов во время проведения исследования. По исходным клиническим характеристикам пациенты не различались. На фоне терапии статинами в обеих группах отмечалось обусловленное основным гиполипидемическим свойством статинов снижение уровня общего ХС, ХС ЛНП. На фоне интенсификации терапии аторвастатином отмечалось увеличение относительного содержания в крови популяции CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Трег, увеличение соотношения CD4⁺Fохр3⁺ Трег/Tх17 и уменьшение соотношения Тх-акт/Трег. В группе больных, принимавших розувастатин, подобных изменений не наблюдалось. По содержанию других субпопуляций CD4⁺ лимфоцитов, В-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток различий в обеих группах больных не выявлено. Статины не влияли на количество и субпопуляционный состав моноцитов крови (таблица 2).

Эффекты аторвастатина и розувастатина в культуре лимфоцитов и макрофагов человека

В культуре CD4⁺лимфоцитов, выделенных из крови доноров, статины дозозависимо подавляли индуцированную ФГА и ИЛ-2 пролиферацию клеток, преимущественно Фохр3-негативных (рисунок 3). Эффект аторвастатина был более выраженным, по сравнению с розувастатином, и наблюдался при меньших концентрациях препарата (начиная с 10нМ). Подавляя пролиферацию, статины препятствовали развитию апоптоза – количество активной каспазы-3 в ФГА/ИЛ-2-активированных клетках, инкубированных со статинами, было снижено. После инкубирования со статинами подвижность клеток, спонтанная и в градиенте SDF-1, падала (рисунок 4). При одинаковых концентрациях препаратов (20 нМ) эффект аторвастатина на миграцию клеток был более выраженным. Анализ фенотипа клеток не выявил существенных различий в экспозиции клетками хемокиновых рецепторов CCR4, CCR5, CXCR3, CXCR4. Пре-инкубирование лимфоцитов со статинами также не

оказывало влияния на фосфорилирование внутриклеточных протеинкиназ Akt и p42/44 (ERK1/2) митоген-активируемых киназ как до, так и после воздействия на клетки SDF-1. Таким образом, статины не влияли на способность лимфоцитов воспринимать стимулирующий миграцию сигнал, а ингибирующее хемотаксис действие статинов, по-видимому, обусловлено подавлением собственно клеточной подвижности.

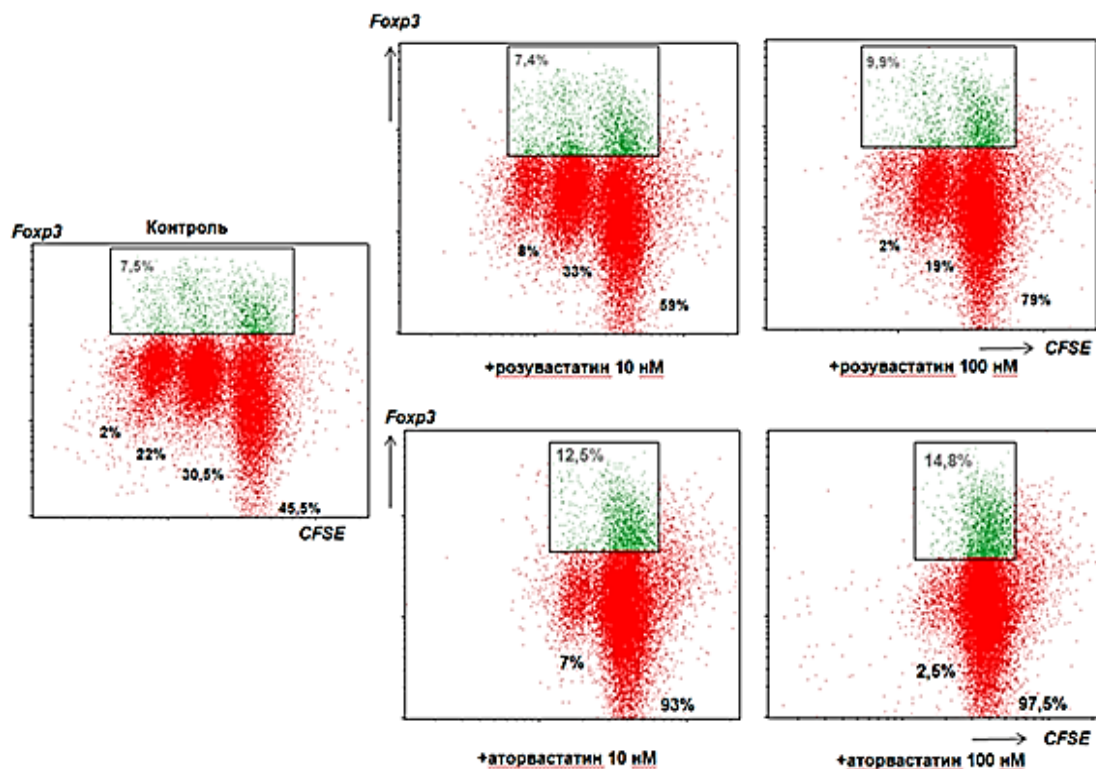


Рисунок 3. Влияние статинов на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. В качестве контроля взяты клетки, активированные ФГА и ИЛ-2. Красным шрифтом указано относительное количество CD4⁺ лимфоцитов, прошедших 0-4 цикла деления; зеленым шрифтом — относительное содержание CD4⁺Foxp3⁺ клеток в культуре.

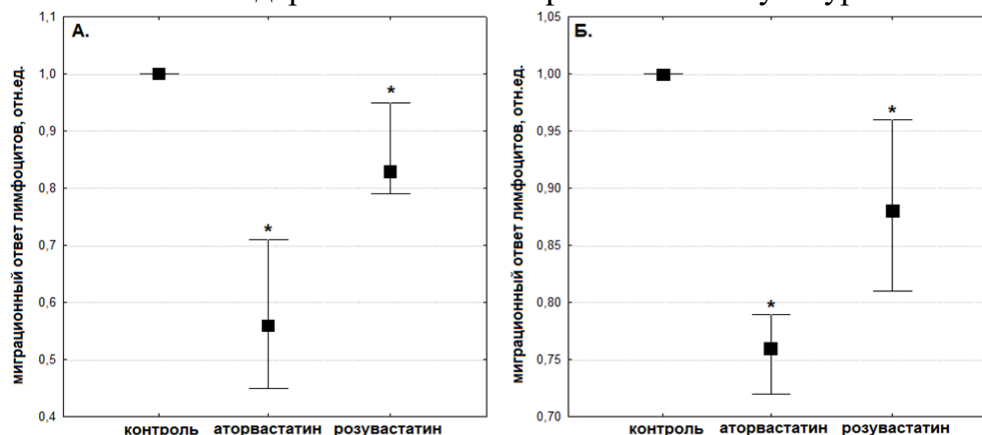


Рисунок 4. Спонтанная (А) и индуцированная SDF-1 (Б) миграция CD4⁺ лимфоцитов, пре-инкубированных со статинами (20нМ, 72ч). За «1» принят миграционный ответ клеток, не подвергавшихся действию статинов. Данные представлены как медиана и минимум-максимум. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Микроскопический анализ культур моноцитов/макрофагов (Мн/Мф) показал, что при инкубировании с ГМ-КСФ в течение 6 суток клетки распластывались на пластике, приобретая округлую или «веретенообразную» форму, и постепенно увеличивались в размерах. Добавление статинов в среду культивирования препятствовало увеличению размеров и распластыванию клеток, многие из них сохраняли шарообразную форму (рисунок 5). При одинаковых концентрациях эффект аторвастатина был более выраженным по сравнению с эффектом розувастатина.

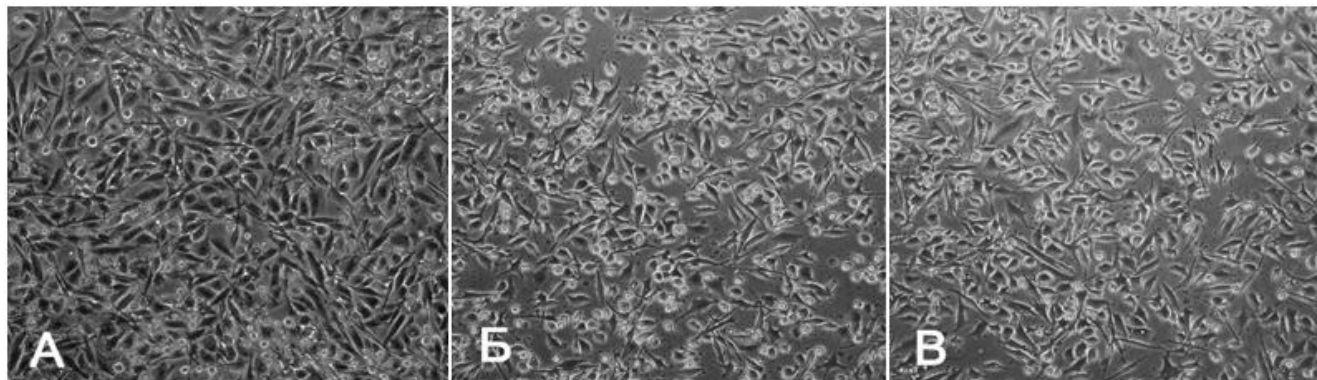


Рисунок 5. Влияние статинов на морфологию Мф. А – контроль, Б – аторвастатин, 10 нМ, В – розувастатин, 10 нМ. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение $\times 100$.

После воздействия статинов количество мембранных белков (молекул адгезии CD11c, молекул, участвующих в презентации антигенов CD86, CD80, CD83, HLA-DR, а также толл-подобных рецепторов CD282, CD284) на Мн/Мф было снижено пропорционально изменению размеров клеток. Следовательно, статины не оказывали влияния на плотность поверхностных белков. Содержание цитокинов (ФНО, ИЛ-1 β , -6, -10, -12) в супернатантах культур активированных Мн/Мф после преинкубирования со статинами было ниже, чем в контроле без статинов. Большей активностью обладал аторвастатин (его эффект проявлялся при меньшей концентрации), добавление мевалоната устраняло действие статинов (таблица 3). Пре-инкубирование Мн/Мф со статинами не оказывало влияния на фосфорилирование внутриклеточных протеинкиназ Akt и pERK $\frac{1}{2}$ митоген-активируемых киназ как до, так и после воздействия на клетки ЛПС/ИНФ γ . Существенных изменений количества мРНК ИЛ-1, -6 и -8 в активированных Мн/Мф, предобработанных статинами, также не обнаружено, следовательно статины подавляли продукцию цитокинов на посттрансляционном уровне.

Анализ экспрессии активной каспазы-3 в ЛПС/ИНФ γ -активированных макрофагах показал, что относительное количество вступивших в апоптоз клеток

снижается после предобработки аторвастатином и, в меньшей степени, розувастатином (рисунок 6). Таким образом, статины, нарушая дифференцировку макрофагов в сторону провоспалительного (т.н. M1) фенотипа, они препятствуют развитию апоптоза.

Таблица 3 – Содержание цитокинов в среде культивирования Мн/Мф, преинкубированных со статинами (72ч) и активированных ЛПС/ИНФγ (20ч)

Статин и доза	ФНО	ИЛ-6	ИЛ-10	ИЛ-1β	ИЛ-12
Розувастатин, 2нМ	83 (75;90)	96 (91;100)	100 (90;110)	99 (90;110)	100
Розувастатин, 10нМ	69 (65;74)*	69 (60;80)*	90 (80;100)	75 (60;83)#	47
Аторвастатин, 2нМ	49 (44;56)	61 (44;80)*	71 (60;93)#	53 (45;60)*	41
Аторвастатин, 10нМ	29 (24;5)*	41 (33;48)*	50 (40;57)*	50 (40;59)*	39
Аторвастатин, 10нМ +мевалонат (10мкМ)	95 (90;100)	-	93 (88;98)	-	-

Данные представлены в отн.ед., * $p < 0,05$, # $p = 0,05$; за 100 отн.ед. принято содержание цитокинов в среде культивирования клеток, не подвергавшихся воздействию статинов. Приведены данные для 5-ти экспериментов (для ИЛ-12 был выполнен 1 эксперимент).

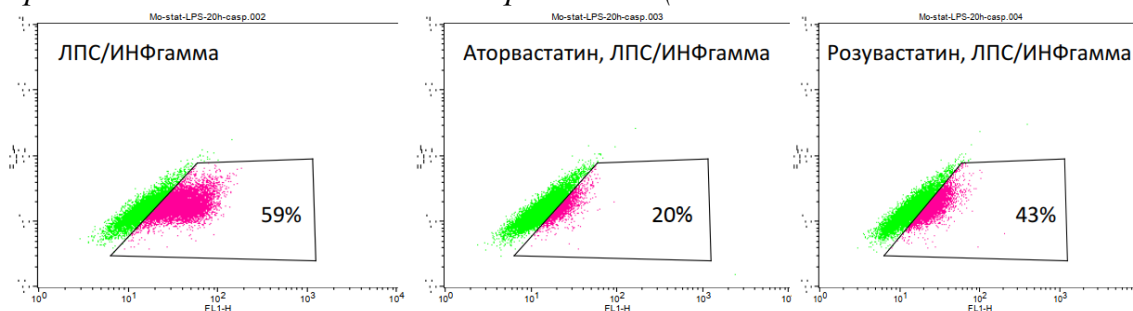


Рисунок 6. Влияние статинов на экспрессию активной каспазы-3 активированными макрофагами.

Содержание эффекторных и регуляторных субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов и моноцитов в крови у пациентов с атеросклерозом коронарных и/или сонных артерий в зависимости от возраста

Для анализа возрастных особенностей показателей Т-клеточного иммунитета было включено 111 некурящих мужчин, медиана возраста 63 (55;69), с подтвержденным инструментально (КАГ, УЗДС БЦА) АС коронарных и/или сонных артерий. Пациенты были разделены на три возрастные группы: I – до 55 лет (n=23), II – 55-64 лет (n=42), III – ≥ 65 лет (n=46). Группы были сопоставимы по основным клинико-лабораторным параметрам и традиционным факторам риска, степени выраженности АС коронарных и

сонных артерий, а также частоте приема лекарственных препаратов. У пациентов группы III абсолютное содержание CD4+ Т-клеток и CD4+CD45RA+ Т-клеток, CD4+CD25high и CD4+CD25highCD45RA+ Трег было ниже, по сравнению с группами I и II (рисунок 7). Отмечена тенденция к снижению уровня CD4+Fоxp3+ Трег в группах II и III, по сравнению с группой I. Количество циркулирующих эффекторных и регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов в крови пациентов в зависимости от возраста не изменялось.

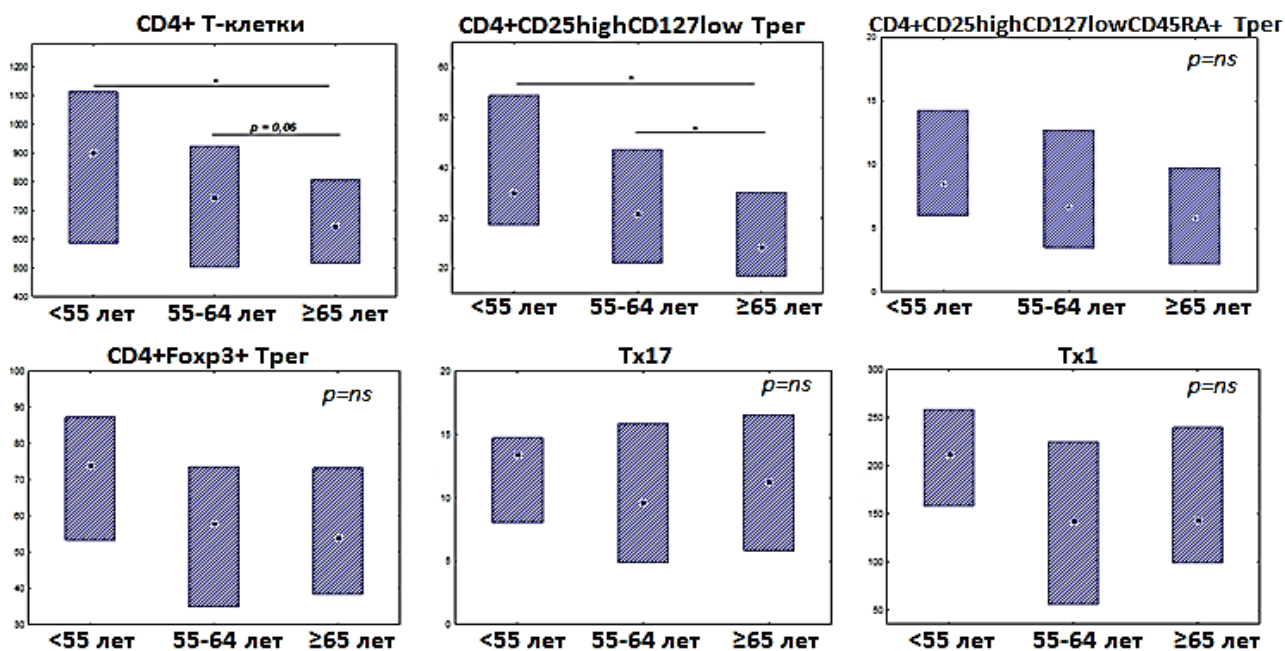


Рисунок 7. Содержание CD4+ Т-клеток, CD4+CD25highCD127low, CD4+CD25highCD127lowCD45RA+ и CD4+Fоxp3+ Трег, Тх17, Тх1 в различных возрастных группах. Данные представлены как медиана и интерквартильный размах, абсолютные значения. * - $p < 0,05$.

У 121 пациента, медиана возраста 61,0 (55,0;67,0), проведен сравнительный анализ абсолютного количества моноцитов крови разных популяций при разделении на группы по возрасту и выраженности коронарного АС, по данным КАГ. Подсчет баллов тяжести коронарного АС проводился с использованием 17-сегментной коронарной модели [Sponder M; 2014] с введением модификации [Arnold KA; 2019]. Разделение пациентов на основании суммы баллов по шкале оценки тяжести коронарного АС представлено на рисунке 8.

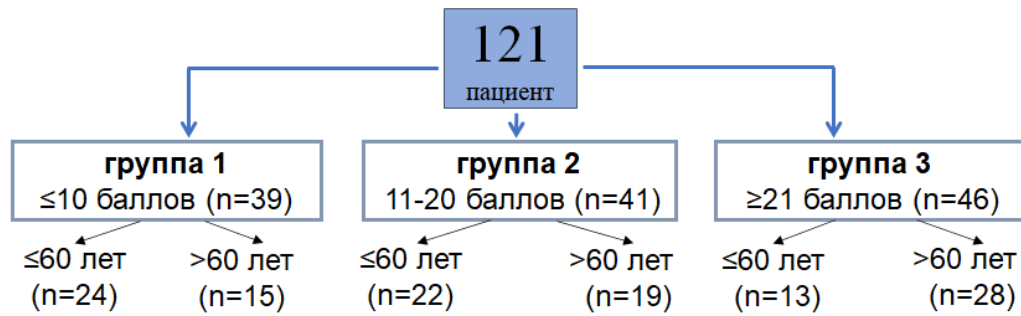


Рисунок 8. Разделение пациентов на группы сравнения.

Группы пациентов были сопоставимы по клиническим характеристикам (частота артериальной гипертензии и сахарного диабета, индекс массы тела, статус курения), за исключением возраста (пациенты группы 3 были старше, по сравнению с группой 1), и основным лабораторным параметрам (таблица 4).

У пациентов моложе 60 лет абсолютное количество промежуточных моноцитов периферической крови было выше в группе 3, по сравнению с группой 1, отмечалась тенденция к более высокому количественному содержанию промежуточных моноцитов в группе 2, по сравнению с группой 1 ($p=0,071$). Повышенное содержание промежуточных моноцитов $\geq 25 \times 10^3/\text{мл}$ было ассоциировано с коронарным АС (гр. 1 против гр. 2+3, $\text{AUC}=0,69$ (0,54-0,83), $p=0,014$, $\text{ОШ}=5,0$ (1,63-15,35), $p=0,005$). У пациентов старше 60 лет уровень моноцитов крови и абсолютное содержание классических моноцитов были ниже в группе 3, по сравнению с группой 1. Сниженное абсолютное содержание классических моноцитов $< 277 \times 10^3/\text{мл}$ было ассоциировано с коронарным АС (гр. 1 против гр.2+3, $\text{AUC}=0,71$ (0,56-0,86), $p=0,015$, $\text{ОШ}=3,8$ (1,10-13,45), $p=0,035$).

Таблица 4 – Клинико-лабораторная и иммунологическая характеристика пациентов с различной выраженностью коронарного АС и отсутствием поражения. Данные представлены как медиана и интерквартильный размах. P_{1-3} , P_{1-2} - при попарном межгрупповом сравнении анализируемых параметров для пациентов сопоставимого возраста с разной степенью АС; P_3 – представлены зарегистрированные значения p при попарном межгрупповом сравнении анализируемых параметров в группе 3 для пациентов до 60 и старше 60 лет

Показатель	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	<60 лет (n=24)	>60 лет (n=15)	<60 лет (n=22)	>60 лет (n=19)	<60 лет (n=13)	>60 лет (n=28)
Возраст, годы	53.0 (47.5;57.5)	63.0 (61.0;65.0)	52.0 (45.0;56.0)	64.0 (62.0;70.0)	56.0 (54.0;57.0)	68.5 (65.0;74.5) P₁₋₃<0.05
Пол, мужчины, n (%)	22 (92%)	8 (53%)	22 (100%)	12 (63%)	12 (92%)	20 (71%)
Курение, n (%)	11 (46%)	1 (7%)	12 (54%)	3 (16%)	8 (61%)	6 (21%)
Артериальная гипертензия, n (%)	14 (58%)	10 (67%)	20 (91%)	17 (89%)	12 (92%)	24 (86%)
Сахарный диабет, n (%)	0 (0%)	2 (13%)	2 (9%)	3 (16%)	1 (7%)	7 (25%)
Индекс массы тела, кг/м ²	30.0 (27.0;31.0)	28.0 (25.0;32.0)	28.5 (25.0;34.0)	28.0 (25.0;32.0)	26.5 (25.0;28.0)	29.0 (27.0;30.0)
Глюкоза, ммоль/л	5.7 (5.1;5.8)	5.8 (5.1;6.6)	5.6 (5.3;6.2)	5.6 (5.4;6.6)	5.7 (5.3;6.2)	5.9 (5.4;6.7)
Общий холестерин, ммоль/л	4.9 (3.5;6.9)	5.5 (4.4;6.6)	4.5 (3.3;6.0)	4.3 (3.7;5.3)	4.4 (4.1;5.2)	4.1 (3.8;5.3)
ТГ, ммоль/л	1.3 (0.8;1.5)	1.3 (0.9;2.2)	1.5 (1.1;1.7)	1.3 (1.1;2.2)	1.4 (1.1;2.0)	1.2 (1.1;1.8)
ХС ЛВП, ммоль/л	1.2 (1.1;1.4)	1.3 (1.1;1.5)	0.8 (0.8;1.1)	1.0 (0.9;1.3)	0.9 (0.8;1.1)	1.1 (1.0;1.2)
ХС ЛНП, ммоль/л	2.5 (1.7;4.7)	2.7 (2.4;4.1)	3.6 (2.4;4.2)	2.2 (1.6;2.2)	2.9 (2.6;4.2)	2.3 (1.8;4.2)
Лейкоциты (10 ⁶ /ml)	7.0 (5.1;8.5)	6.6 (5.9;8.0)	7.2 (6.5;8.6)	6.2 (5.7;8.0)	9.4 (7.6;10.0)	6.3 (5.3;7.2) P₃<0,05
Моноциты (10 ⁶ /ml)	0.47 (0.36;0.63)	0.40 (0.32;0.68)	0.46 (0.34;0.61)	0.37 (0.25;0.52)	0.49 (0.38;0.73)	0.32 (0.28;0.38) P₁₋₃, P₃<0,05
Неклассические моноциты (10 ³ /ml)	66.6 (42.8;98.2)	70.3 (52.0;130.2)	62.5 (46.0;82.7)	46.8 (36.6;77.4)	73.4 (50.3;93.1)	65.4 (45.6;83.6)
Промежуточные моноциты (10 ³ /ml)	18.8 (12.9;38.3)	27.3 (17.2;39.0)	33.1 (18.4;45.0) P₁₋₂=0.07	30.5 (18.8;37.0)	45.8 (32.0;75.2) P₁₋₃<0.05	27.2 (21.7;35.2) P₃<0,05
Классические моноциты (10 ³ /ml)	345.7 (284.3;455.4)	301.1 (242.4;540.0)	335.4 (253.2;504.0)	285.8 (157.4;394.7)	369.7 (277.4;514.2)	226.7 (175.2;279.0) P₁₋₃, P₃<0,05

ВЫВОДЫ

1. Повышенное содержание Тх17 в крови ассоциируется с выраженностью атеросклероза ВСА, но не ОСА.
2. У пациентов с содержанием ХС ЛНП крови менее 3,5 ммоль/л и прогрессированием АС сонных артерий исходное содержание в кровотоке CD4+ Т-лимфоцитов и Тх17 выше, а соотношение Трег/Тх17 ниже, по сравнению с пациентами без прогрессирования АС. Данные показатели обладают высокой чувствительностью и специфичностью в отношении прогрессирования АС сонных артерий у больных с уровнем ХС ЛНП крови менее 3,5 ммоль/л в течение 1 года.
3. Терапия аторвастатином ассоциируется с дозозависимым возрастанием относительного содержания Трег, увеличением соотношения Трег/Тх17 и уменьшением соотношения Тх-акт/Трег. На фоне терапии розувастатином указанные различия не выявляются.
4. Статины дозозависимо подавляют миграцию и пролиферацию эффекторных CD4+ лимфоцитов доноров при активации в культуре, приводя к увеличению относительного содержания Трег. Статины подавляют дифференцировку выделенных из крови доноров моноцитов в макрофаги, снижают способность макрофагов к активации, ингибируя на посттранскрипционном уровне продукцию ими цитокинов. Действие аторвастатина на лимфоциты и макрофаги проявляется при более низких концентрациях, по сравнению с розувастатином.
5. У пациентов с атеросклерозом коронарных артерий наблюдается снижение с возрастом количества циркулирующих Трег на фоне неизменного уровня эффекторных Т-лимфоцитов, преимущественно вследствие снижения содержания наивных CD45RA+клеток. У пациентов с атеросклерозом коронарных артерий общее количество моноцитов и количество классических моноцитов ниже, а количество промежуточных моноцитов выше, по сравнению с группой контроля без атеросклероза. Содержание классических моноцитов ниже у пациентов с наиболее тяжелым поражением коронарного русла. У более молодых пациентов среди моноцитов преобладают промежуточные формы, в то время как у пациентов старшей возрастной группы отмечается расширение неклассических форм за счет снижения содержания классических моноцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациентов с АС сонных артерий, достигших снижения значений показателей липидного спектра, рекомендовано определение иммунного статуса (соотношения Трег/Тх17) для определения риска быстрого прогрессирования АС и своевременной коррекции терапии.
2. У пациентов, получающих терапию статинами, при проведении лабораторных исследований следует учитывать влияние данных препаратов на иммунный статус. При назначении статина следует учитывать, что в терапевтических дозах аторвастатин обладает иммуномодулирующей активностью, что может оказывать дополнительное положительное влияние у пациентов с Тх17-ассоциированными заболеваниями и провоспалительным статусом, связанных с недостаточностью Трег.
3. Рекомендуется определение субпопуляций моноцитов у пациентов различных возрастных категорий для оценки у них риска наличия и выраженности АС.
4. Рекомендуется использовать материалы диссертации в учебных программах в высших учебных заведениях медицинского профиля, а также на кафедрах последипломного образования.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Pylaeva E.A. Opposite changes of regulatory T cell blood content may differentially contribute to atherosclerosis or lymphoproliferative disorders / E.A. Pylaeva, A.V. Potekhina, O.A. Pogorelova, M.I. Tripoten, T.V. Balakhonova, **A.Yu. Filatova** [et al]. // Oncoreview. – 2016. – № 1. – P. A29–A36.
2. Кузнецова Г.В. Влияние аторвастатина на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у пациентов со стабильной стенокардией напряжения / Г.В. Кузнецова, А.В. Потехина, Т.И. Арефьева, Н.Ю. Рулева, **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2016. – № 4. – С. 30–39.
3. **Филатова А.Ю.** Субпопуляционный состав CD4⁺ Т-лимфоцитов как фактор, способствующий прогрессированию атеросклероза сонных артерий / **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Кардиология. – 2017. – № 4. – С. 64–71.
4. **Филатова А.Ю.** Влияние аторвастатина и розувастатина у пациентов с атеросклерозом на показатели клеточного иммунитета и на активацию лейкоцитов *in vitro* / **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Российский кардиологический журнал. – 2018. – № 8. – С.59–64.
6. Арефьева Т.И. Иммуотропные эффекты ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (статинов) и их возможные механизмы / Т.И. Арефьева, **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Биохимия. – 2018. – № 8. – С. 1111–1129.
7. **Филатова А.Ю.** Низкое содержание ИЛ-10-продуцирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови как фактор риска прогрессирования коронарного атеросклероза / **А.Ю.**

Филатова [и соавт.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – № 9. – С. 300–303.

8. **Филатова А.Ю.** Атеросклероз брахиоцефальных артерий и артериальная жесткость у больных раком молочной железы / **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Кардиология. – 2019. – № 1S. – С. 43–52.

9. Щинова А.М. Особенности Т-клеточного иммунитета при атеросклерозе. Возможности в диагностике и лечении / А.М. Щинова, А.В. Потехина, **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Кардиологический вестник. – 2020. – № 1. – С. 14-19. DOI: 10.36396/MS.2020.16.1.002.

10. **Filatova A.Yu.** The severity of internal carotid artery stenosis is associated with the circulating Th17 level / **A.Yu. Filatova** [et al.]. // Heliyon. – 2020. – № 5. – P. e03856.

11. Рулева Н.Ю. Ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А редуктазы (статины) подавляют дифференцировку и ЛПС/ИФН γ -индуцированную продукцию цитокинов в культуре моноцитов/макрофагов человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины / Н.Ю. Рулева, Н.В. Радюхина, Е.С. Зубкова, **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – № 8. – С. 209–214.

12. Afanasieva O.I. The association of lipoprotein(a) and circulating monocyte subsets with severe coronary atherosclerosis / O.I. Afanasieva, **A.Yu. Filatova** [et al.]. // Journal of Cardiovascular Development and Disease. – 2021. – № 6. – P. 63.

13. **Filatova A.Y.** Age-associated characteristics of CD4+ T-cell composition in patients with atherosclerosis / **A.Y. Filatova** [et al.]. // Immuno. – 2021. – № 3. – P. 277–284. DOI: 10.3390/immuno1030019.

14. Радюхина Н.В. Ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (статины) подавляют пролиферацию и подвижность CD4+ Т-лимфоцитов человека в культуре / Н.В. Радюхина, Н.Ю. Рулева, **А.Ю. Филатова** [и соавт.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – № 8. – С. 162–167.

Патент на изобретение: Способ диагностики предрасположенности к прогрессированию атеросклероза сонных артерий у лиц с нормолипидемией по содержанию CD4+ Т-лимфоцитов в периферической крови. Арефьева Т.И., Афанасьева О.И., Балахонова Т.В., Клесарева Е.А., Ноева Е.А., Осокина А.К., Погорелова О.А., Пылаева Е.А., Трипотень М.И., **Филатова А.Ю.**, Потехина А.В. № регистрации в ФИПС 2016118237, 2016, регистрация патента 13.10.2017.

Список сокращений:

АС – атеросклероз

БЦА – брахиоцефальные артерии

ВСА – внутренняя сонная артерия

ГМ-КСФ - гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИЛ – интерлейкин

ИНФ - интерферон

КАГ – коронароангиография

ЛНП – липопротеиды низкой плотности

ЛПС - липополисахарид

Мн/Мф – моноциты/макрофаги

ОСА - общая сонная артерия

ОШ – отношение шансов

Тх – Т-хелперы

Тх-акт – активированные Т-хелперы

Трег – регуляторные Т-лимфоциты

УЗДС - ультразвуковое дуплексное сканирование

ФГА – фитогемагглютинин

ХС – холестерин

ЭКГ - электрокардиография

CFSE – сукцинимидиловый эфир

карбоксифлуоресцеина

SDF-1 – стромальный клеточный фактор 1