

На правах рукописи

ПОГОНЧЕНКОВА ДАРЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ДИСБАЛАНС СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ И
ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МЕДИАТОРОВ КРОВИ В ПАТОГЕНЕЗЕ
ИШЕМИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Чумакова
Светлана Петровна

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Уразова
Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН,
руководитель НИИ терапии и
профилактической медицины –
филиала ИЦиГ СО РАН

Рагино
Юлия Игоревна

доктор медицинских наук, профессор,
руководитель лаборатории клеточно-
молекулярной физиологии и патологии
НИИ медицинских проблем Севера –
обособленного подразделения
ФИЦ КНЦ СО РАН

Савченко
Андрей Анатольевич

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ).

Защита диссертации состоится: «__» _____ 2021 г. в __ . __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <https:ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В структуре заболеваемости и смертности населения развитых стран мира лидирующие позиции занимают заболевания системы кровообращения. Наиболее частой причиной возникновения хронической сердечной недостаточности (ХСН) является ишемическая болезнь сердца (ИБС). Симптомы ХСН лежат в основе клинической картины как ИБС, так и ишемической кардиомиопатии (ИКМП), которая отличается от других хронических форм ИБС формированием кардиомегалии и дилатацией камер сердца [Ziaeiian B., Fonarow G.C., 2016; Bhandari B. et al., 2020]. Количество впервые выявленных случаев ИБС среди россиян за 2013-2018 гг. уменьшилось, при этом доля кардиомиопатий возросла на 8,7% [Бокерия Л.А., 2019].

Клинические исходы и прогноз ИКМП при ИБС значительно хуже, чем при дилатационной и гипертрофической кардиомиопатиях [Alter D.T. et al., 2012; Guddeti R.R. et al., 2014; Гавриш А.С., Пауков В.С., 2015]. При этом средний возраст пациентов с впервые диагностированной ИКМП составляет 45-55 лет [Ziaeiian B., Fonarow G.C., 2016; Pfeffer M.A. et al., 2019].

Патогенез ИКМП мало изучен, активно обсуждается роль в ее развитии воспаления и гипоксии как индукторов фиброза и ведущих типовых процессов, лежащих в основе ремоделирования миокарда [Frangogiannis N.G., 2019]. Исходя из ключевой роли макрофагов в фиброзообразовании и воспалении, актуальной является проблема участия в патогенезе ИКМП клеток моноцитарно-макрофагального ряда: тканевых макрофагов и моноцитов крови, дифференциация которых находится под контролем цитокинового профиля крови и микроокружения в тканях.

В настоящее время описана иммунофенотипическая и функциональная гетерогенность моноцитов, среди которых различают классические $CD14^{++}CD16^{-}$ клетки, отвечающие за фагоцитоз, промежуточные $CD14^{++}CD16^{+}$ моноциты, обладающие провоспалительными и антигенпрезентирующими свойствами, неклассические $CD14^{+}CD16^{++}$ или «патрулирующие» клетки, характеризующиеся протективной функцией в отношении эндотелия, и переходные $CD14^{+}CD16^{-}$, эффекторный потенциал которых неизвестен. Промежуточные и неклассические моноциты являются продуцентами интерлейкина (IL)- 1β и фактора некроза опухоли (TNF)- α , а классические – IL-10 [Thomas G. et al., 2015; Villani A.C. et al., 2017; Ożańska A. et al., 2020]. В тканях моноциты дифференцируются в макрофаги: классически активированные макрофаги (M1) обладают выраженной способностью к фагоцитозу и киллингу, синтезу провоспалительных цитокинов; альтернативно активированные макрофаги (M2) характеризуются секрецией IL-12, IL-10, трансформирующего фактора роста (TGF)- β , коллагена и низкой способностью к фагоцитозу (элиминируют апоптозные тельца) [Murray P.J., Wynn T.A., 2011; Никонова А.А. и соавт., 2016].

До сих пор остается неясным участие моноцитов различных иммунофенотипов в патогенезе ИКМП. Неизвестно, как цитокиновый спектр крови влияет на субпопуляционный состав моноцитов при ИКМП и как перераспределение клеток в кровотоке соотносится с клиническим статусом пациента. Нет четкого представления о том, что опаснее – инфильтрация миокарда клетками с провоспалительной активностью или, напротив, клетками с противовоспалительными свойствами, способными активировать фибробласты и синтез коллагена. Не определены лабораторные критерии,

отражающие механизм развития ИКМП. Изложенное определяет актуальность изучения особенностей субпопуляционного состава моноцитов крови и ее медиаторного спектра у больных ИКМП.

Степень разработанности темы исследования. Участие клеток моноцитарно-макрофагальной системы в процессах ремоделирования стенки сосудов при атеросклерозе и сердца после инфаркта миокарда прослеживается на всех этапах развития ИБС. На фоне ее стабильного течения наблюдается увеличение численности промежуточных моноцитов в крови. Накопление данной субпопуляции положительно коррелирует с ростом концентрации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в кровотоке. При этом риск дестабилизации бляшки и высокая вероятность возникновения сердечно-сосудистой «катастрофы» связаны с увеличением числа моноцитов промежуточного типа [Wacleche V.S. et al., 2018].

Произошедшее острое коронарное событие является пусковым механизмом генерации моноцитов в костном мозге и миграции их в миокард [Latet S.C. et al., 2015]. В раннем постинфарктном периоде рекрутированные в очаг ишемии моноциты представлены в основном классической субпопуляцией. Показано, что умеренная их деактивация может обеспечивать кардиопротективный эффект и уменьшать миомаляцию [Hulsmans M., 2016; Sager H.V. et al., 2016]. В острый период инфаркта миокарда моноциты в тканях трансформируются в M1-макрофаги и синтезируют провоспалительные цитокины. На 3-4-й день постинфарктного периода наступает старт репарации [Humeres C. et al., 2016; Frodermann V., 2018]. Рекрутированные в эти сроки моноциты трансформируются в макрофаги с «альтернативной» поляризацией [Hilgendorf I. et al., 2014; Humeres C. et al., 2016]. Последние секретируют сосудистый эндотелиальный фактор роста, TGF- β , IL-10, которые запускают неоангиогенез и стимулируют миофибробласты, синтезирующие компоненты внеклеточного матрикса [Ismahil M.A. et al., 2014; Prabhu S.D., 2016; Sager H.V. et al., 2016; Jung M. et al., 2017].

Впоследствии естественное течение постинфарктного периода характеризуется смещением медиаторного спектра в пользу противовоспалительных цитокинов, увеличивается концентрация IL-10, который проявляет ангиопротекторные и антиатеросклеротические свойства [Sager H.V. et al., 2016; Jung M. et al., 2017]. На этом этапе может произойти нарушение репаративных процессов, когда фиброобразование перестает ограничиваться постинфарктной зоной и запускается чрезмерное и пролонгированное фибрирование миокарда вследствие хронического воспаления [Ismahil M.A. et al., 2014; Prabhu S.D., 2016; Talman V., 2016]. Последнее сопровождается экспрессией галектина-3 – хемоаттрактанта макрофагов, активатора их альтернативной трансформации и синтетической функции фибробластов [Драпкина О.М., 2015; Suthahar N. et al., 2018]. Кроме того, гипоксия может потенцировать воспаление и фиброз путем синтеза индуцируемых гипоксией факторов (HIF-1 и HIF-2), влияющих на синтез про- и противовоспалительных цитокинов [Mylonis I., 2019]. Со временем аккумулированные в миокарде макрофаги начинают фагоцитировать не только погибшие кардиомиоциты, но и гипоксически поврежденные клетки уже за пределами зоны некроза, способствуя вторичной альтерации кардиомиоцитов. В соответствии с преобладающей популяцией макрофагов в тканях и субпопуляцией моноцитов в крови наблюдается гиперсекреция про- или противовоспалительных цитокинов [Mills C.D., 2014; Yunna C. et al., 2020].

Клиническим проявлением патологического ремоделирования миокарда с развитием чрезмерного фиброза становится прогрессирующее ХСН. В связи с этим при ИКМП нарастает концентрация мозгового натрийуретического пептида в крови, что отражает преднагрузку на сердце, но уже как следствие снижения его насосной функции и результат ремоделирования миокарда. Патогенетически значимые маркеры формирования ИКМП у больных ИБС пока не установлены [Pasipoularides A., 2015; Pfeffer M.A. et al., 2019; Branca L. et al., 2020].

Учитывая исследовательские работы последних лет о фенотипической гетерогенности мононуклеарных фагоцитов и влиянии цитокинов на субпопуляционный состав моноцитов крови, а также высокую социальную значимость заболеваний сердечно-сосудистой системы, представляется важным изучение роли моноцитов различных иммунофенотипов и спектра иммунорегуляторных медиаторов крови в патогенезе ИКМП, имеющей крайне неблагоприятный прогноз.

Цель исследования: установить особенности и общие закономерности нарушений субпопуляционного состава моноцитов и баланса иммунорегуляторных медиаторов в крови и их связь с клиническим статусом у больных ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать субпопуляционный состав моноцитов крови у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией.
2. Определить концентрацию иммунорегуляторных медиаторов (цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , M-CSF и галектина-3) в крови и дать оценку их влияния на субпопуляционный состав моноцитов крови у больных ИБС, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией.
3. Выявить общие закономерности и различия нарушений субпопуляционного состава моноцитов и баланса иммунорегуляторных медиаторов крови у больных ИБС, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией, во взаимосвязи с клиническими показателями основного заболевания и характером сопутствующей патологии.
4. Определить патогенетические факторы, влияющие на формирование ишемической кардиомиопатии (многомерный факторный анализ), и ее дифференциальные показатели в сравнении с ИБС без кардиомиопатии (метод логистической регрессии) на основе дисбаланса субпопуляционного состава моноцитов и содержания иммунорегуляторных медиаторов в крови.

Научная новизна. Впервые установлены особенности субпопуляционного состава моноцитов крови при ИКМП и ИБС, неосложненной ИКМП, и проведен анализ взаимосвязей между содержанием моноцитов отдельных иммунофенотипов и концентрацией иммунорегуляторных медиаторов в крови у больных с кардиомиопатией. Получены актуальные сведения о модулирующем влиянии плазменной концентрации IL-10 и галектина-3 на численность неклассических и классических моноцитов крови при ИКМП. Важным аспектом исследования является сопоставление численности субпопуляций моноцитов крови с клиническим статусом, характером коморбидности и антропометрическими характеристиками у больных ИКМП, что позволило впервые

доказать взаимосвязь дефицита неклассических моноцитов в крови с изменениями морфофункциональных параметров левого желудочка при ИКМП и показать протективную роль этих клеток в ремоделировании миокарда. Принципиально новым стало выявление патогенетических факторов развития ИКМП, отражающих иммуносупрессию и нарушение регуляции дифференциации M1/M2-макрофагов, с помощью многомерного факторного анализа массива параметров субпопуляционного состава моноцитов и медиаторного спектра крови, и установление на их основе дифференциальных показателей ИКМП, отражающих особенности ее патогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы. При ИКМП нарушения субпопуляционного состава моноцитов крови, характерные для ИБС без ИКМП, не регистрируются, что свидетельствует о гипергии моноцитарно-макрофагальной системы в условиях атерогенеза. При этом соотношение иммунофенотипов моноцитов в крови взаимосвязано с плазменной концентрацией IL-10, галектина-3 и колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) и определяется характером их дисбаланса, который различается при ИБС, осложненной и неосложненной ИКМП. Между тем, нарушение баланса провоспалительных цитокинов в крови при ИБС не проявляет особенностей в зависимости от наличия ИКМП.

Согласно многомерному факторному анализу, в патогенезе ИКМП имеют значение сочетание недостаточности дифференциации неклассических и переходных моноцитов и избытка IL-10 в крови (отражают иммуносупрессию), и нарушения сбалансированной регуляции моноцитарно-макрофагальной системы, зависящей от концентрации от M-CSF и TNF- α в крови. При этом отличительной чертой ИКМП (по сравнению с группой больных ИБС без ИКМП) является низкое содержание неклассических моноцитов, избыток IL-10 и галектина-3 в крови, что обосновывает актуальность поиска молекулярных мишеней для разработки таргетной терапии ИКМП. Полученная в ходе исследования математическая модель распознавания ИКМП путем сочетанного определения содержания неклассических моноцитов и галектина-3 в крови может быть использована для выявления среди больных ИБС пациентов с ИКМП. Кроме того, данная ассоциация параметров крови может стать дифференциальным признаком последующего развития ИКМП у больных ИБС с еще сохранной фракцией выброса левого желудочка, а также использована для динамического наблюдения у больных с верифицированной ИКМП. Изложенное определяет целесообразность дальнейших исследований, доказывающих эффективность прогнозирования ИКМП на основе выявленных закономерностей и ориентированных на разработку методов таргетной клеточной терапии ИКМП.

Результаты исследования используются на кафедре патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в учебном процессе по дисциплинам «Патофизиология, клиническая патофизиология» (на врачебных факультетах для специальностей 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия), «Патология (патологическая физиология)» (в ординатуре для укрупненной группы специальностей 31.00.00 Клиническая медицина) и «Гематология» (на медико-биологическом факультете для специальности 30.05.01 Медицинская биохимия).

Методология и методы исследования. Для реализации поставленных задач были обследованы больные ИБС с недостаточностью кровообращения II-III

функционального класса, страдающие и не страдающие ИКМП. Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь в объеме 10 мл, взятая утром натощак в асептических условиях. Оценка субпопуляционного состава моноцитов проводилась в цельной крови методом проточной цитофлуориметрии по экспрессии CD14-, CD16-молекул на мембране клеток. Концентрацию цитокинов (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, M-CSF, TNF- α , интерферона (IFN)- γ) и галектина-3 в плазме крови измеряли методом иммуноферментного анализа. Исследования осуществлялись в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии на базе кафедры патофизиологии (заведующий – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О.И. Уразова) и Центральной научно-исследовательской лаборатории (руководитель – д-р мед. наук, профессор РАН Е.В. Удуд) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Положения, выносимые на защиту:

1. Развитие ишемической кардиомиопатии (ИКМП) сопровождается нехарактерным для ишемической болезни сердца (ИБС) без кардиомиопатии дефицитом неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов в крови.
2. Особенности дисбаланса иммунорегуляторных медиаторов плазмы крови (галектина-3, IL-10, M-CSF) у больных ИБС, страдающих и не страдающих кардиомиопатией, взаимосвязаны с численностью классических CD14⁺⁺CD16⁻ и неклассических моноцитов в крови. Плазменная концентрация цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ при развитии ИКМП и у больных без ИКМП является сопоставимой.
3. При ишемической кардиомиопатии ремоделирование миокарда (увеличение массы и конечного диастолического индекса) связано с дефицитом неклассических моноцитов при повышении концентрации IL-10 в крови.
4. Сочетанное увеличение содержания галектина-3 и снижение числа неклассических моноцитов в крови позволяет дифференцировать кардиомиопатию у больных с ИБС с точностью более 80%.

Степень достоверности и апробация результатов. Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, что подтверждается достаточным объемом клиничко-лабораторного материала, использованием современных методов исследований (проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ) и сертифицированного оборудования, а также адекватных цели и задачам критериев статистического анализа данных.

Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на VI Евразийском съезде кардиологов (Москва, 18-19 апреля 2018 г.); VII Евразийском съезде кардиологов (Ташкент, 16-17 мая 2019 г.); II Международной конференции «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.); Научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и при патологии», посвящённой 130-летию кафедры физиологии СибГМУ и НИ ТГУ (Томск, 23-24 мая 2019 г.); Российском национальном конгрессе кардиологов (Екатеринбург, 24-26 сентября 2019 г.); II Научно-практической конференции «Фундаментальные проблемы управления системой крови» (Москва, 25 октября 2019 г.); Международной научной конференции «Scientific research of the SCO countries:

synergy and integration» (Пекин, КНР, 30 декабря 2020 г.).

Работа осуществлена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7) и Российского фонда фундаментальных исследований (№18-015-00160).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, списка сокращений и литературы. Работа иллюстрирована 6 рисунками и 14 таблицами. Библиографический указатель включает 280 источников, из них 16 отечественных и 264 зарубежных авторов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 8 – в журналах, включенных в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки России рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 5 (4 тезисов и 1 статья) в материалах научных конференций, конгрессов и съездов.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Соискатель принимал непосредственное участие в разработке концепции, дизайна и планировании исследования, формулировании его цели и задач. Им лично проведен анализ историй болезней пациентов, забор биологического материала у здоровых доноров, выполнены клиничко-лабораторные исследования, статистически обработаны, проанализированы и обсуждены результаты, оформлен иллюстративный материал и текст диссертации, лично или в соавторстве подготовлены публикации по теме диссертационной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель, основные задачи исследования, научная новизна, практическое и теоретическое значение работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме исследования: приведена характеристика ИКМП, освещены особенности ее течения в сравнении с другими формами кардиомиопатий. Часть главы посвящена истории термина и классификации ИКМП. Охарактеризованы возможные патогенетические процессы, лежащие в ее основе. Дана общая характеристика различных фенотипов макрофагов и описано их участие в патогенезе атеросклероза, острого инфаркта миокарда и кардиомиопатий. Представлен обзор данных по иммунофенотипической и функциональной гетерогенности моноцитов, влиянию цитокинов на макрофагально-моноцитарную систему, изменению субпопуляционного состава моноцитов и цитокинового профиля крови при кардиоваскулярной патологии, особенно при ИБС.

Во второй главе диссертации описаны объект, материал и методы исследования. Исследования проведены с разрешения локального этического комитета (протокол №8512/1 от 08.12.2020 г.). У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на участие в исследовании.

В ходе выполненной работы было обследовано 52 больных с ИБС в возрасте от 44 до 70 лет (средний возраст 62,5 [57,0; 66,5] лет), страдающих и не страдающих ИКМП (Таблица 1), которым выполнялась операция коронарного шунтирования, и 18

относительно здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с группами пациентов (14 мужчин и 4 женщины, средний возраст 56,0 [43,0; 65,0] лет). Диагноз ИБС устанавливался на основании жалоб пациента, анамнестических и объективных данных, параклинических показателей (электрокардиография, эхокардиография, кардиовентрикулография, сцинтиграфия, эмиссионная компьютерная томография).

Критериями исключения из исследования было наличие онкопатологии, гематологических заболеваний и болезней, ассоциированных с иммунной гиперчувствительностью (аутоиммунных, аллергических), ВИЧ-инфекции, хронических вирусных гепатитов, сифилиса, проведение курсов иммуномодулирующей терапии, обострение хронического или дебют острого инфекционного заболевания в момент исследования, отказ от исследования.

Материалом для исследования служила гепаринизированная (25 Ед/мл) кровь, взятая из кубитальной вены утром натощак в асептических условиях (10 мл).

Таблица 1 – Характеристика исследуемых групп больных с ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией

Показатели		Больные ИБС без ИКМП	Больные ИБС с ИКМП	p-value
Количество больных:		22	30	-
мужчины, %		18 (81,81%)	27(90,00%)	0,658
женщины, %		4 (18,18%)	3(10,00%)	0,658
Возраст, лет		64,0 [59,5; 68,0]	61,0 [56,0; 64,0]	0,110
Функциональный класс стенокардии	II	4 (18,18%)	7 (23,33%)	0,916
	III	16 (72,73%)	20 (66,67%)	0,870
	IV	2 (9,09%)	3 (10,00%)	0,714
Функциональный класс недостаточности кровообращения (по NYHA)	I	2 (9,09%)	2 (6,67%)	0,840
	II	9 (40,91%)	19 (63,33%)	0,187
	III	11 (50,00%)	9 (30,00)	0,240
Фракция выброса ЛЖ, %		59,50 [50,25; 67,00]	30,00 [22,00; 36,00]	<0,001
Конечный диастолический объем ЛЖ, мл		94,50 [88,00; 125,00]	229,0 [213,0; 278,0]	<0,001
Конечный диастолический индекс ЛЖ, мл/м ²		18,07 [14,60; 27,05]	80,93 [72,16; 101,2]	<0,001
Масса миокарда ЛЖ, г		187,5 [142,8; 215,0]	233,5 [222,3; 265,3]	0,001
Выраженность стеноза коронарных артерий, %		74,38 [67,50; 75,00]	67,50 [56,25; 75,00]	0,392
Гипертоническая болезнь III степени		18 (81,81%)	21 (70,00%)	0,517
Холестерол, ммоль/л		3,29 [3,00; 3,70]	4,00 [3,60; 4,80]	0,140
ХНМК, %		13 (59,1%)	27 (90,0%)	0,023
Сахарный диабет типа 2		7 (31,82%)	2 (6,67%)	0,046

Примечание. ЛЖ – левый желудочек, ХНМК – хронические нарушения мозгового кровообращения, ЖКТ – желудочно-кишечный тракт, p – уровень статистической значимости различий между группами больных; здесь и далее в таблицах: ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИКМП – ишемическая кардиомиопатия.

Иммунофенотипирование моноцитов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии в цельной крови после предварительного удаления эритроцитов лизирующим буфером (FACSLysingsolution («BD Biosciences», США). В полученной после лизиса эритроцитов суспензии клеток определяли относительное содержание классических ($CD14^{++}CD16^{-}$), промежуточных ($CD14^{++}CD16^{+}$), неклассических ($CD14^{+}CD16^{++}$) и переходных ($CD14^{+}CD16^{-}$) моноцитов методом проточной лазерной двухцветной цитофлуориметрии на проточном цитометре «Accuri C6» («BD Biosciences», США) с использованием моноклональных антител к CD14 и CD16 (CD14-FITC и CD16-PE) («BD Biosciences», США), принимая за 100% все клетки, положительные по CD14. Для определения клеточности полученной суспензии осуществлялся подсчет ядросодержащих клеток крови с помощью камеры Горяева. Методом иммуноферментного анализа оценивали концентрацию медиаторов в плазме крови, используя коммерческие наборы: «IL-1 бета-ИФА-БЕСТ», «IL-4-ИФА-БЕСТ», «IL-6-ИФА-БЕСТ», «IL-10-ИФА-БЕСТ», «альфа-TNF-ИФА-БЕСТ» и «гамма-IFN-ИФА-БЕСТ» производства АО «Вектор-БЕСТ» (г. Новосибирск); «RayBioHuman M-CSF ELISA Kit» («RayBiotech», США), галектин-3 («Thermofisher Scientific», США).

Статистический анализ полученных результатов осуществляли с помощью Statistica 10.0 и Microsoft Excel. Для статистического описания результатов данные выражали в виде медианы (Me), 1-го и 3-го квартилей (Q1 и Q3). Проверку выборки на соответствие нормальному закону распределения вариант проводили методом Шапиро-Уилка. Для сравнительного анализа использовали в случае соответствия выборки нормальному закону t-критерий Стьюдента, при несоответствии – непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения частот встречаемости качественных признаков использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В ходе корреляционного анализа вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Для установления направленности взаимосвязей между признаками проводили однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. В случае несоответствия распределения вариант нормальному закону или неравенства дисперсий использовали критерий Краскела-Уоллеса. Вклад факторной переменной в детерминацию признака оценивали по отношению межгрупповой дисперсии к общей дисперсии выборки.

Для комплексной интерпретации массива данных проводили многомерный факторный анализ, исключая параметры, имеющие в выборках только нулевые значения и коррелирующие между собой с коэффициентом более 0,70. Признак считали значимым для выявляемого фактора при его факторной нагрузке более 0,70. С целью поиска параметров, определяющих исход процесса, и позволяющих его диагностировать и прогнозировать, выполняли логистический регрессионный анализ. Вычисляли чувствительность и специфичность полученных моделей. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

Третья глава диссертационной работы посвящена описанию полученных результатов. Продемонстрировано сравнение субпопуляционного состава моноцитов и содержания цитокинов и галектина-3 в крови у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП. Определены взаимосвязи между показателями субпопуляционного состава моноцитов крови, ее медиаторного профиля и клинического статуса у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП. Выделены патогенетические факторы

развития ИКМП методом многофакторного анализа. Получены модели дифференциации ИКМП от ИБС без ИКМП. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками.

В четвертой главе проведен анализ и обсуждение полученных оригинальных данных с привлечением сведений, представленных в современной научной литературе.

Анализ данных показал, что у пациентов с ИБС, не страдающих ИКМП, отмечается пониженное содержание классических $CD14^{++}CD16^{-}$ и переходных $CD14^{+}CD16^{-}$ клеток на фоне избытка промежуточных $CD14^{++}CD16^{+}$ моноцитов и нормального содержания неклассических $CD14^{+}CD16^{++}$ клеток в крови (Таблица 2). При этом у больных ИКМП определялся, напротив, дефицит неклассических моноцитов при соответствующем норме содержанию остальных трех субпопуляций моноцитов с тенденцией к изменениям, аналогичным у больных ИБС без ИКМП (Таблица 2).

Таблица 2 – Содержание моноцитов различных субпопуляций в крови у больных ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией, Ме [Q1; Q3]

Показатель	Здоровые доноры	Больные ИБС без ИКМП	Больные ИБС с ИКМП
Классические $CD14^{++}CD16^{-}$ моноциты, %	66,2 [61,34; 74,06]	49,60 [35,57; 61,73] $p_k=0,039$	49,90 [36,72; 65,98] $p_k=0,125$; $p=0,696$
Промежуточные $CD14^{++}CD16^{+}$ моноциты, %	16,51 [14,90; 17,98]	31,39 [27,04; 52,68] $p_k=0,038$	39,53 [14,01; 56,16] $p_k=0,174$; $p=0,803$
Неклассические $CD14^{+}CD16^{++}$ моноциты, %	10,69 [9,34; 13,84]	8,11 [7,05; 10,83] $p_k=0,263$	5,43 [3,44; 7,86] $p_k=0,003$; $p=0,055$
Переходные $CD14^{+}CD16^{-}$ моноциты, %	6,84 [5,03; 7,70]	2,86 [2,62; 3,90] $p_k=0,008$	3,84 [2,59; 7,40] $p_k=0,374$; $p=0,148$

Примечание. Здесь и далее в таблицах: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИКМП – ишемическая кардиомиопатия; p_k – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем у здоровых доноров; p – у больных ИБС без ИКМП.

По данным литературы, классические моноциты способны дифференцироваться в промежуточные клетки [Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010; Patel A.A. et al., 2017], что согласуется с полученными в настоящем исследовании отрицательными взаимосвязями между численностью этих клеток в крови у больных ИБС, как страдающих (Рисунок 1А), так и не страдающих (Рисунок 1Б) ИКМП. При этом у пациентов с ИКМП определялись положительные связи между содержанием классических и переходных моноцитов и между числом промежуточных и неклассических клеток в крови (Рисунок 1Б). Следовательно, при ИКМП дефицит неклассических клеток и отсутствие избытка промежуточных моноцитов обусловлены угнетением их трансформации из менее дифференцированных классических и переходных клеток.

В основе развития и прогрессирования ИБС лежит коронарный атеросклероз, при котором модифицированные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) выступают в качестве антигенов, опосредуя увеличение численности промежуточных моноцитов, обладающих антигенпрезентирующими свойствами и способностью взаимодействовать с Т-лимфоцитами [Foster G.A. et al., 2013; Biessen, E.A.L., 2017]. Однако почему при ИКМП численность промежуточных моноцитов остается в пределах нормы, хотя

атеросклероз коронарных сосудов (как и при ИБС без ИКМП) регистрируется?

Другой отличительной характеристикой ИКМП в сравнении с ИБС без ИКМП стало снижение численности неклассических (патрулирующих) моноцитов (Таблица 2). Ключевая роль последних заключается в утилизации иммунных комплексов и погибших клеток с поверхности сосудистого эндотелия [Carman C.V., 2003; Rains J.L., 2011]. В связи с этим и вследствие зарегистрированного дефицита неклассических моноцитов при ИКМП атеросклероз у них может перейти на качественно новый уровень с вовлечением сосудов мелкого калибра, поскольку не подвергшийся утилизации «клеточный мусор» с модифицированными ЛПНП провоцирует альтерацию эндотелия мелких артерий. Проатерогенное значение недостаточности неклассических моноцитов подтверждается отрицательной корреляцией их количества в крови со степенью стеноза коронарных артерий (усредненная величина ввиду многососудистого поражения) у больных ИБС, как страдающих (Рисунок 1А), так и не страдающих (Рисунок 1Б) ИКМП.

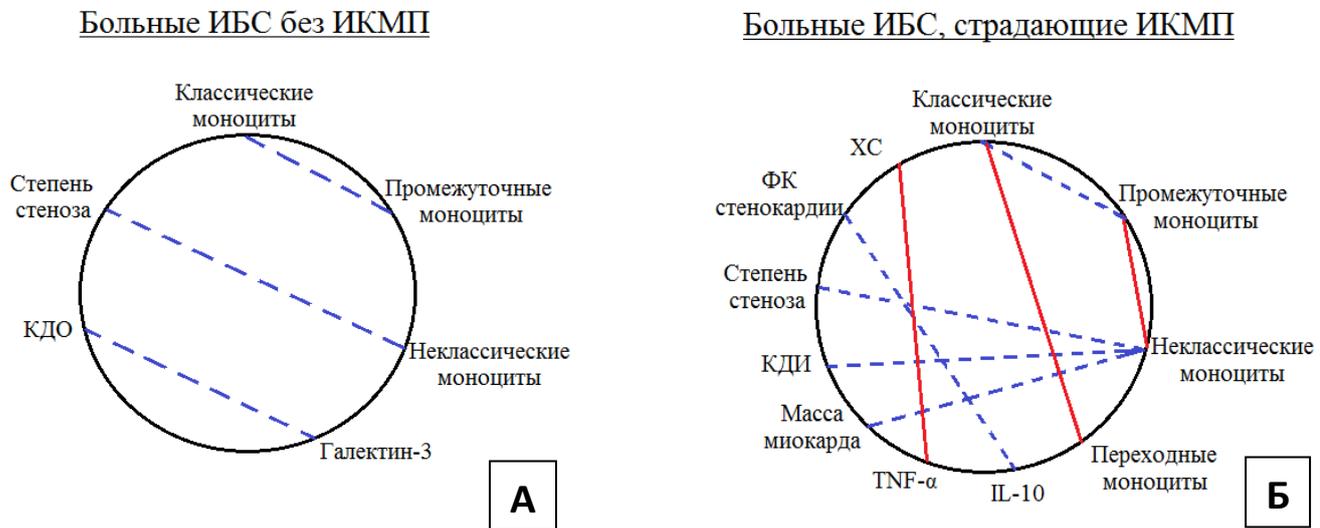


Рисунок 1 – Данные корреляционного анализа показателей субпопуляционного состава моноцитов крови, ее медиаторного профиля и параметров клинического статуса у пациентов с ишемической болезнью сердца: А – без ишемической кардиомиопатии, Б – страдающих ишемической кардиомиопатией.

Примечание: КДО – конечный диастолический объем, КДИ – конечный диастолический индекс, IL – интерлейкин, TNF – фактор некроза опухоли, ФК – функциональный класс, ХС – холестерин, пунктирная линия – отрицательная корреляция, сплошная – положительная корреляция.

В подтверждение большей распространенности атеросклероза, как системного заболевания, у пациентов с ИКМП определялась более частая встречаемость хронических нарушений мозгового кровообращения (в 1,5 раза по сравнению с больными ИБС без ИКМП), а также положительная взаимосвязь между концентрацией холестерина и TNF-α в крови и отрицательная корреляция численности неклассических моноцитов в крови с конечным диастолическим индексом и массой миокарда левого желудочка (Рисунок 1Б). Подобные зависимости не отмечались у больных ИБС без ИКМП (Рисунок 1А), что указывает на особенности патогенеза ИКМП. Испытывая недостаточность кислорода, даже гипертрофированный миокард при ИКМП не может

эффективно сокращаться, что уменьшает фракцию выброса левого желудочка (Таблица 1) и увеличивает конечный диастолический индекс у больных ИКМП (Таблица 1). Согласно данным корреляционного анализа, именно в нарастании массы миокарда и диастолической дисфункции принимают участие неклассические моноциты (Рисунок 1Б). Дефицит этих клеток в крови, являющихся рециркулирующими моноцитами/макрофагами [Van Dongen J.J.M. et al., 2014], у больных ИКМП может быть связан с накоплением их в тканях, где они, как макрофаги, опосредуют гипертрофию и фиброз.

Кроме хронического воспаления в стенке сосуда, ИБС и ИКМП характеризуются гипоксией. Хроническая гипоксия и хроническое воспаление, как базовые типовые патологические процессы в патогенезе ИБС, сопровождаются секрецией медиаторов воспаления, среди которых иммунорегуляторными свойствами обладают цитокины и галектины [Foster G.A. et al., 2013; Biessen E.A.L., 2017]. Цитокины условно классифицируются на провоспалительные (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , M-CSF) и противовоспалительные (IL-4, IL-10, TGF- β) белки, часть из которых способны оказывать модулирующие действие на дифференциацию моноцитов/макрофагов (TNF- α , IFN- γ , M-CSF, IL-4, IL-10, TGF- β) [Mohan M.L., 2017].

Известно, что продукция IL-1, IL-6 и TNF- α усиливается не только в процессе атерогенеза, но и в условиях хронического ишемического повреждения миокарда [Mohan M.L., 2017; Shahid F., 2018]. Поэтому содержание TNF- α в крови у пациентов с ИБС обеих групп было выше, чем у здоровых доноров (Таблица 3), а у больных ИКМП коррелировало с уровнем холестерина в крови (Рисунок 1Б): TNF- α активирует эндотелиальные клетки, вызывая воспаление в интиме сосуда [Gerbod-Giannone M.C. et al., 2006; Newby A.C., 2008]. При этом концентрация IL-6 и IL-1 β в крови у пациентов с ИБС, как страдающих, так и не страдающих ИКМП, соответствовала норме (Таблица 3).

Таблица 3 – Содержание медиаторов в крови у больных ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией, Ме [Q1; Q3]

Показатель	Здоровые доноры	Больные ИБС без ИКМП	Больные ИБС с ИКМП
IL-1 β , пг/мл	1,21 [0,00; 1,79]	1,96 [0,35; 2,74] $p_k=0,096$	1,78 [0,04; 3,65] $p_k=0,134; p=0,744$
IL-6, пг/мл	1,88 [1,10; 2,10]	2,10 [1,10; 4,2] $p_k=0,366$	2,00 [1,80; 4,25] $p_k=0,303; p=0,497$
TNF- α , пг/мл	0,64 [0,00; 0,83]	1,16 [0,90; 1,82] $p_k=0,028$	2,08 [1,04; 3,60] $p_k=0,046; p=0,265$
IL-4, пг/мл	0,15 [0,05; 0,65]	0	0
IFN- γ , пг/мл	3,00 [0,00; 6,00]	0 [0,00; 0,01]	0 [0,00; 0,01]
IL-10, пг/мл	21,00 [20,50; 28,00]	24,00 [22,00; 28,00] $p_k=0,459$	30,00 [27,00; 36,00] $p_k=0,049; p=0,036$
M-CSF, пг/мл	2,50 [1,60; 4,40]	0,20 [0,00; 1,20] $p_k=0,047$	1,00 [0,40; 1,70] $p_k=0,177; p=0,097$
Галектин-3, нг/мл	7,07 [6,50; 7,43]	6,10 [4,30; 7,48] $p_k=0,722$	8,00 [7,20; 9,20] $p_k=0,048; p=0,025$

Примечание: IL – интерлейкин; TNF – фактор некроза опухоли; M-CSF – колониестимулирующий фактор макрофагов.

Биологическая роль IL-6 находится в созависимости от других провоспалительных цитокинов (IL-1 β и TNF- α) [Rose-John S., 2018]. Показано, что IL-6 и С-реактивный белок служат биомаркерами тяжести и риска сердечно-сосудистой патологии [Aday A.W., 2019]. Между тем, концентрация IL-1 β и IL-6 в крови у больных ИБС обеих групп сохранялась в пределах нормы, не имея существенных различий в сравнении с группой контроля (Таблица 3). Возможно, это связано с наличием у обследованных лиц стабильной формы стенокардии и компенсированной ХСН. Профицит IL-6 в крови обнаружен у пациентов с острой сердечной недостаточностью, а IL-6 и IL-1 β – при декомпенсированной ХСН и инфаркте миокарда [Токмачев Р.Е., 2016].

Другим провоспалительным цитокином считается IFN- γ , который вместе с IL-4 модулирует адаптивный иммунный ответ организма человека [Bosurgi L. et al., 2017; Castro F. et al., 2018]. Концентрация IFN- γ и IL-4 в крови у больных ИБС обеих групп соответствовала нулевым значениям, чего не отмечалось у здоровых доноров (Таблица 3). Однако даже у последних концентрация IL-4 крови в среднем составила менее 1 пг/мл, что согласуется с данными производителя ИФА-набора о варьировании этого параметра у здоровых лиц в диапазоне 0-4 пг/мл. Очевидно, низкий уровень IL-4 в крови отражает его паракринное действие на иммунокомпетентные клетки в очаге воспаления и лимфоидных органах даже в условиях атерогенеза [Herrero-Fernandez B. et al., 2019].

Между тем, концентрация IFN- γ в крови у здоровых доноров существенно отличалась от нуля, а у больных ИБС соответствовала таковому (Таблица 3). Это можно рассматривать как проявление иммуносупрессии клеточного звена иммунитета при ИБС, что согласуется с данными литературы о дефиците IFN- γ у больных ХСН [Cappuzzello S., 2011]. Известно, что IFN- γ индуцирует поляризацию макрофагов в классически активированные M1-клетки [Herrero-Fernandez B. et al., 2019], а IL-4 – в альтернативно активированные M2-макрофаги, обуславливая также синтез галектина-3 [Bosurgi L. et al., 2017]. Учитывая эти свойства IFN- γ и IL-4 и их дефицит в крови у пациентов (Таблица 3), в организме при ИБС вне зависимости от наличия ИКМП создаются условия для дисфункции моноцитарно-макрофагальной системы.

Дополнительным индуктором дифференциации M2-макрофагов и продуктом их секреции является IL-10, который способен угнетать функцию антигенпрезентирующих клеток и синтез провоспалительных цитокинов [Никонова А.А. и соавт., 2017]. Считается, что IL-10 замедляет прогрессирование атеросклероза [Herrero-Fernandez B. et al., 2019]. Видимо, по этой причине у больных ИКМП обнаруживалась отрицательная корреляция содержания этого цитокина в крови с функциональным классом стенокардии (Рисунок 1Б). Однако избыток IL-10, вероятно, оказывает негативное влияние на ремоделирование сердца, поскольку профицит этого цитокина определялся у пациентов с ИКМП, а у больных ИБС без ИКМП его содержание соответствовало норме (Таблица 3). Учитывая роль IL-10 как индуктора и продукта секреции M2-макрофагов с профибротическими свойствами [Jung M. et al., 2017], его избыток, вызванный долговременной гипоксией [Dase D.S., 2008], создает условия для дифференциации M2-клеток и продукции ими еще большего количества IL-10, потенцируя фиброз.

Согласно результатам однофакторного дисперсионного анализа, у больных ИБС без ИКМП не обнаруживалось ни влияния соответствующей норме концентрации IL-10 на численность неклассических моноцитов, ни обратного влияния. При этом у больных

ИКМП концентрация IL-10 была повышенной и детерминировала число неклассических моноцитов в крови ($p=0,045$), в то время как их численность не влияла на уровень цитокина в кровотоке ($p=0,135$). При этом вклад IL-10 в вариабельность пула данных клеток в крови у больных ИКМП составлял 57,7% (по соотношению межгрупповой и общей дисперсий), то есть IL-10 играет ведущую роль в детерминации количества неклассических моноцитов при ИКМП. Механизм этого может быть связан с ингибированием дифференциации неклассических моноцитов IL-10 или отражать накопление в тканях макрофагов, продуцирующих IL-10. Последнее угнетает рециркуляцию клеток моноцитарно-макрофагального ряда в виде неклассических моноцитов. В обоих случаях избыток IL-10 у больных ИКМП предрасполагает к генерации M2-макрофагов.

Крайне важным цитокином для дифференциации, выживания и функционирования клеток моноцитарно-макрофагального ряда является M-CSF, который усиливает созревание моноцитов в макрофаги, их жизнеспособность и поглощение ими ЛПНП, поэтому представляет собой важное звено в патогенезе атеросклероза [Шварц Я.Ш., 2011]. Концентрация M-CSF в крови была пониженной у больных ИБС без ИКМП, а у лиц, страдающих этим заболеванием, – не отличалась от нормы, проявляя только аналогичную тенденцию (Таблица 3).

Известно, что в физиологических условиях контроль за дифференциацией моноцитов и макрофагов определяется концентрацией M-CSF [Bruder E.D. et al., 2016; Ushach I., 2016]. При этом колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) участвует больше в индукции гемопоэза во время воспаления, чем в поддержании моноцитарно-макрофагальной системы в норме [Bruder E.D. et al., 2016]. Учитывая это и дефицит M-CSF, классических моноцитов с избытком промежуточных клеток в крови у больных ИБС без ИКМП (Таблица 2, 3), допустимо полагать, что у этих пациентов ведущую роль в дифференциации моноцитов на фоне атеросклероза, как хронического воспаления в стенке артерий, играет гиперпродукция GM-CSF.

Следует отметить, что при очевидной важной роли M-CSF в дифференциации моноцитов корреляционный анализ не выявил линейных связей между ними. При этом однофакторный дисперсионный анализ содержания M-CSF и классических моноцитов в крови зарегистрировал влияние численности последних на концентрацию M-CSF у больных ИБС без ИКМП ($p=0,049$, вклад 58,8%) и в объединенной группе пациентов с ИБС ($p=0,047$, вклад 36,4%) при отсутствии обратной закономерности. Следовательно, численность субпопуляции классических моноцитов определяет концентрацию M-CSF в крови, а не наоборот. Данное влияние является положительным и характерным для всей популяции больных ИБС, но в большей степени оно свойственно пациентам без ИКМП, у которых обнаруживается дефицит классических моноцитов и, как следствие, недостаточность M-CSF в крови. Исходя из данных о способности моноцитов синтезировать M-CSF [Ushach I., 2016] и полученных результатов, следует, что именно классические клетки способны к продукции M-CSF.

Кроме цитокинов, опосредующих дифференциацию моноцитов крови, на этот процесс могут влиять и другие медиаторы. Галектин-3 управляет различными процессами в клетках (пролиферация, апоптоз и др.) и идентифицирован как активный участник в патогенезе различных заболеваний с фиброобразованием [Dong R. et al.,

2018]. Несмотря на описанное в литературе участие галектина-3, как хемоаттрактанта, в атерогенезе [Suthahar N. et al., 2018], его концентрация в крови у больных ИБС без ИКМП регистрировалась в пределах нормы (Таблица 3). Это можно объяснить локальной гиперпродукцией галектина-3 в атероме. Однако у пациентов с ИКМП концентрация галектина-3 в крови была выше, чем у здоровых доноров и у больных ИБС без ИКМП (Таблица 3), что можно трактовать как большую распространенность атеросклероза на фоне ИКМП, чем без таковой (но не большую выраженность, т.к. по степени стеноза группы больных были сопоставимыми; Таблица 1). С другой стороны, более высокое содержание галектина-3 в крови у пациентов с ИКМП, чем у больных, ею не страдающих, может отражать большую интенсивность фиброзирования миокарда при ИКМП, что соответствует патогенетическим основам развития данного заболевания.

Продуцентами галектина-3 являются фибробласты, макрофаги, моноциты, и поврежденные кардиомиоциты [Suthahar N. et al., 2018]. Галектин-3 может активировать покоящиеся фибробласты с дифференциацией их до миофибробластов, стимулировать дифференциацию M2-макрофагов и (как хемоаттрактант) привлекать моноциты в пораженный миокард [Gehlken C. et al., 2018; Suthahar N. et al., 2018]. Это может быть механизмом снижения численности протективных неклассических моноцитов в крови при ИКМП (Таблица 2), представляющих собой рециркулирующие клетки [Van Dongen J.J.M. et al., 2014]. Это формирует порочный круг в патогенезе ИКМП, заключающийся в увеличении распространенности атеросклероза и нарастании ишемии миокарда.

Корреляционный анализ не обнаружил линейных связей между концентрацией галектина-3 и содержанием моноцитов всех четырех иммунофенотипов. При этом однофакторный дисперсионный анализ установил, что концентрация галектина-3 определяет содержание классических моноцитов в крови у больных ИБС в объединенной выборке (на 26,8%, $p=0,018$) и еще более у пациентов с ИКМП (на 62,7%, $p=0,047$), в то время как у больных ИБС без ИКМП подобное влияние отсутствует. Следовательно, не классические моноциты влияют на уровень галектина-3, а галектин-3 на их количество. Учитывая данные о большей способности макрофагов, чем моноцитов, экспрессировать галектин-3 [Ciacchitano S. et al., 2018; Dong R. et al., 2018], его образование при ИКМП, очевидно, происходит в тканях (макрофагами сердца).

Особенности цитокинового дисбаланса крови у пациентов с ИКМП в сравнении с больными ИБС без ИКМП (Таблица 3) могут быть связаны с коморбидным профилем пациентов. В группе больных с ИКМП сахарный диабет типа 2 встречался реже, чем в у пациентов с ИБС без кардиомиопатии. Известно, что предиктором сахарного диабета типа 2 является метаболический синдром, при котором в жировой ткани развивается хроническое неспецифическое воспаление [Russo L., 2018]. Показано, что галектин-3 может связываться с продуктами гликирования белков, способствуя их утилизации [Suthahar N. et al., 2018]. IL-10 усиливает чувствительность адипоцитов к инсулину [Acosta J.R. et al., 2019]. Кроме того, галектин-3 и IL-10 способны перепрограммировать фенотип макрофагов в M2-клетки, в том числе и в жировой ткани [Ciacchitano S., 2018]. Этим может объясняться низкая встречаемость сахарного диабета типа 2 при ИКМП.

В патогенезе ИКМП IL-10 оказался важным цитокином. Его увеличение в крови у пациентов с ИКМП замедляло прогрессирование стенокардии (отрицательная корреляция с классом стенокардии, Рисунок 1Б) и уменьшало численность

неклассических моноцитов в крови (по данным дисперсионного анализа), дефицит которых способствовал нарастанию массы левого желудочка и конечного диастолического индекса (отрицательные корреляции; Рисунок 1Б). Масса миокарда у пациентов с ИКМП была значительно больше, чем у больных ИБС без ИКМП, что сочеталась с низкой фракцией выброса левого желудочка (Таблица 1). Это является доказательством сократительной дисфункции сердца, когда гипертрофированный миокард не способен поддерживать ударный объем на физиологическом уровне.

Ввиду обнаружения нескольких параметров, влияющих на субпопуляционный состав моноцитов крови и развитие ИКМП, был выполнен многомерный факторный анализ. По его результатам на формирование ИКМП влияют два фактора: первый объединяет содержание IL-10, неклассических и переходных моноцитов в крови (определяет 32% риска ИКМП), второй – концентрацию TNF- α и M-CSF (определяет 25,2% риска ИКМП). Интерпретируя результаты, первый фактор более важен и его можно обозначить как «иммуносупрессия» (избыток противовоспалительного цитокина, ассоциированный с дефицитом субтипов моноцитов). Поскольку TNF- α индуцирует дифференциацию моноцитов в M1-макрофаги, а M-CSF – в M2-клетки [Никонова А.А. и соавт., 2017; Чурина Е.Г. и соавт., 2019], то с учетом их отрицательных факторных нагрузок второй фактор следует обозначить как «сбалансированная дифференциация M1/M2-макрофагов». То есть, чем больше концентрация TNF- α или M-CSF в крови, тем меньше сбалансированность дифференциации M1/M2-макрофагов.

По итогам исследования можно сформировать две схемы патогенеза ИБС в постинфарктном периоде в зависимости от наличия ИКМП (Рисунки 2 и 3). Течение ИБС, неосложненной ИКМП, сопровождается дефицитом классических и переходных моноцитов в крови, который может быть вызван их ускоренной дифференциацией в промежуточные клетки в присутствии модифицированных ЛПНП (Рисунок 2). Промежуточные моноциты могут мигрировать как в атерому, где усиливают воспаление и рост бляшки, так и в кооперации с классическими клетками – в ишемизированный миокард, где при ХСН они трансформируются в M2-макрофаги. Это поддерживает немногочисленный пул M2-клеток в миокарде, сформированный из M1-макрофагов в ходе репарации миокарда после инфаркта. Умеренная инфильтрация миокарда M2-макрофагами определяет невысокую продукцию ими галектина-3, что не препятствует естественной рециркуляции клеток моноцитарно-макрофагальной системы в виде неклассических моноцитов и обеспечивает их нормальный уровень в крови. Это поддерживает протекцию эндотелия в норме, что замедляет распространение атеросклероза на другие регионы сосудистого русла, однако профицит промежуточных моноцитов потенцируют увеличение объема уже имеющихся бляшек (Рисунок 2). В итоге при ИБС без ИКМП поражаются атеросклерозом преимущественно крупные артерии сердца, где присутствуют высокие напряжения сдвига, что вызывает очаговую ишемию. Последняя компенсируется развитием коллатералей и перфузируемый миокард гипертрофируется, что уменьшает проявления сердечной недостаточности. Гипоксия миокарда становится умеренной, усиливаясь только во время ангиозных приступов, и обуславливает секрецию TNF- α ишемизированными кардиомиоцитами и фибробластами, угнетает функцию Th1-клеток и синтез IFN- γ , дефицит классических моноцитов определяет низкую продукцию ими M-CSF, а умеренное содержание

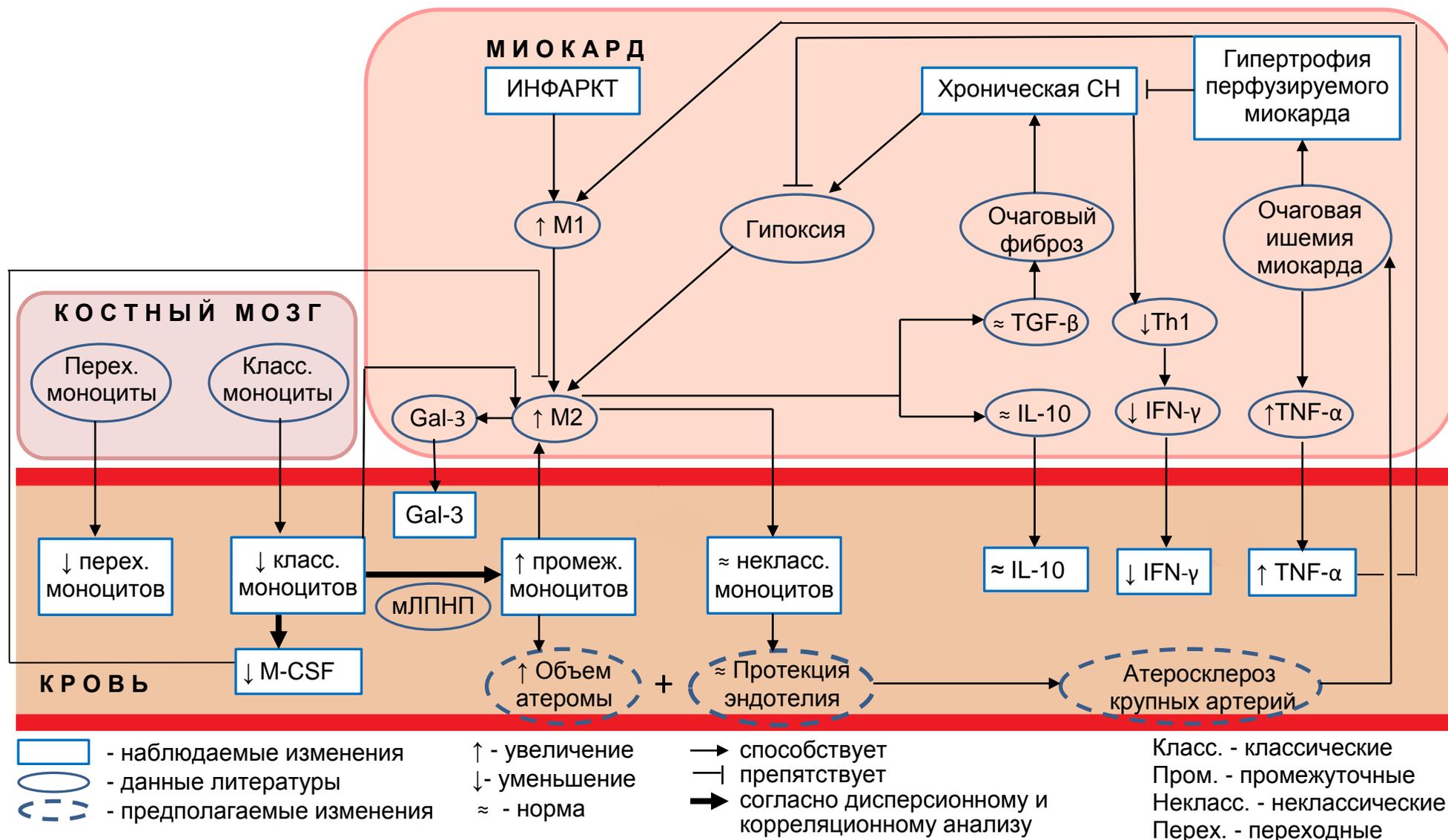


Рисунок 2 – Роль моноцитов в патогенезе ишемической болезни сердца без ишемической кардиомиопатии. *Примечание:* IL – интерлейкин, IFN – интерферон, TNF – фактор некроза опухоли, M-CSF – колониестимулирующий фактор макрофагов, Gal – галектин, TGF – трансформирующий фактор роста, M – макрофаги, Th – T-хелперы, СН – сердечная недостаточность, млПНП – модифицированные липопротеины низкой плотности.

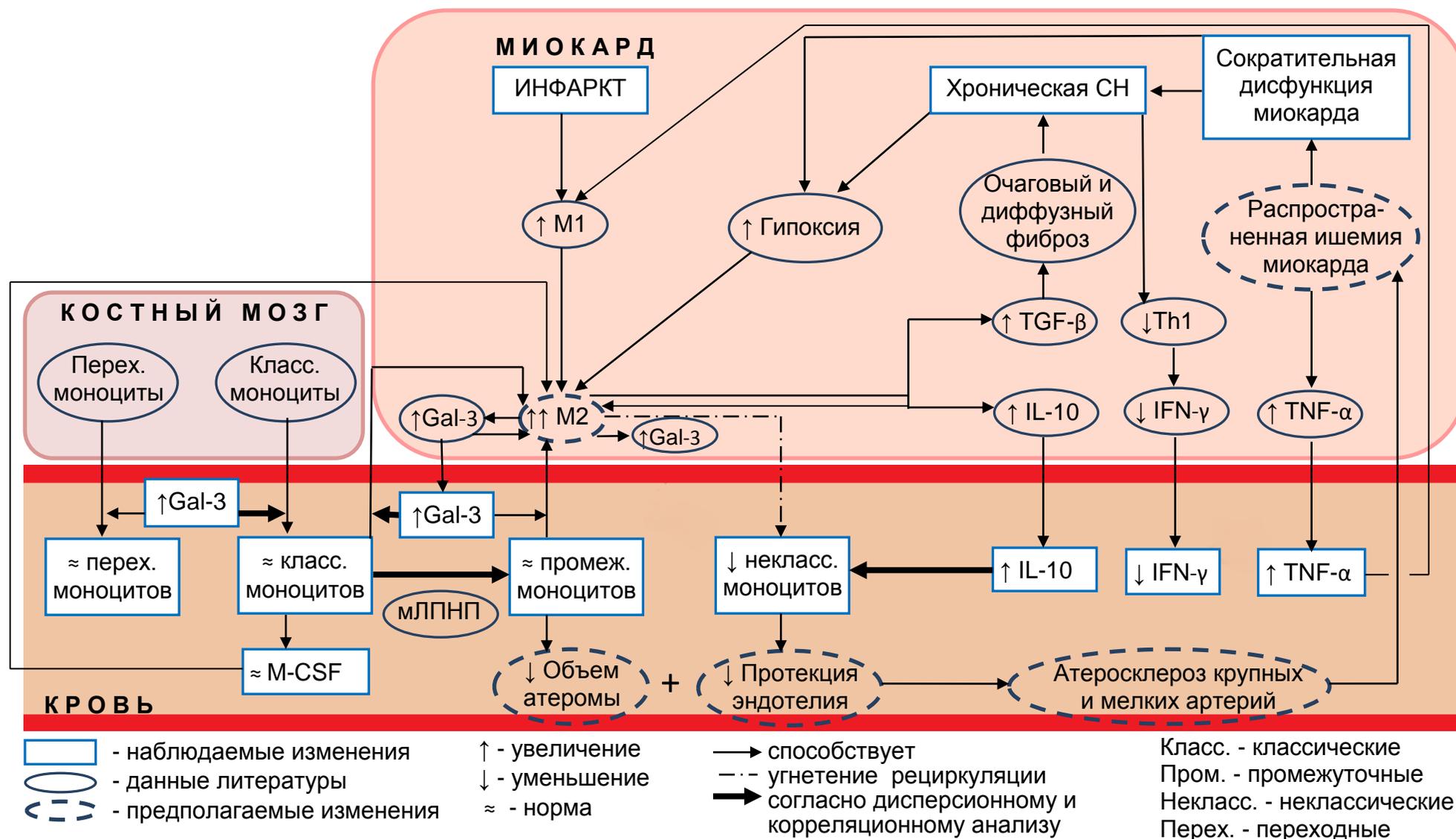


Рисунок 3 – Роль моноцитов в патогенезе ишемической кардиомиопатии. *Примечание:* IL – интерлейкин, IFN – интерферон, TNF – фактор некроза опухоли, M-CSF – колониестимулирующий фактор макрофагов, Gal – галектин, TGF – трансформирующий фактор роста, M – макрофаги, Th – Т-хелперы, СН – сердечная недостаточность, мЛПНП – модифицированные липопротеины низкой плотности.

M2-макрофагов в тканях поддерживает в норме количество неклассических моноцитов, образование IL-10 и, вероятно, TGF- β . Физиологическая концентрация TGF- β не позволяет прогрессировать фиброзу и он ограничивается зоной инфаркта (Рисунок 2).

Формирование ИКМП у больных ИБС ассоциировано с нормальным количеством переходных, классических и промежуточных моноцитов в крови, что может быть связано с большей, чем у больных ИБС без ИКМП, концентрацией галектина-3 в плазме крови (Рисунок 3). Он, как хемоаттрактант, может облегчать миграцию переходных и классических моноцитов из костного мозга в кровь или стимулировать миграцию классических и промежуточных моноцитов в миокард, определяя нормальную численность последних в крови. Гиперпродукция галектина-3 (как и IL-10) обусловлена избытком M2-макрофагов в миокарде, который усиливает их дифференциацию и аккумуляцию. Это снижает содержание неклассических моноцитов в крови, что не обеспечивает защиту эндотелия от иммунных комплексов даже на физиологическом уровне, способствуя распространению атеросклероза на более мелкие сосуды (при этом рост бляшки в объеме немного замедляется из-за профицита IL-10). Распространенная ишемия гипертрофированного миокарда приводит к сократительной его дисфункции, что усугубляет ХСН. Хроническая гипоксия запускает дифференциацию M2-клеток, которые секретируют профибротический TGF- β , и фиброобразование пролонгируется. При этом в крови отмечается не только избыток TNF- α и недостаток IFN- γ (как при ИБС без ИКМП), но и высокое содержание IL-10 и галектина-3 (при физиологической концентрации M-CSF вследствие нормального количества классических моноцитов в крови). Формируется два взаимосвязанных порочных круга в патогенезе ИКМП: один – с участием галектина-3, обеспечивающего аккумуляцию, дифференциацию M2-клеток и гиперпродукцию ими IL-10, TGF- β и самого галектина-3 с формированием дефицита неклассических моноцитов в крови, а второй – при участии IL-10, потенцирующего недостаток этих клеток в крови, что усугубляет поражение коронарных сосудов и хроническую гипоксию, усиливающую дифференциацию M2-клеток (Рисунок 3).

Для поиска дифференциального признака развития ИКМП при ИБС был выполнен логистический регрессионный анализ, установивший, что для этого могут быть использованы содержание галектина-3 и неклассических моноцитов в крови:

$$P = \exp(0,41 - 0,65 \times X_{\text{некл}} + 0,59 \times X_{\text{гал-3}}) / (1 + \exp(0,41 - 0,65 \times X_{\text{некл}} + 0,59 \times X_{\text{гал-3}})),$$

где: $X_{\text{некл}}$ – содержание неклассических моноцитов в крови (%),

$X_{\text{гал-3}}$ – содержание галектина-3 в крови (нг/мл),

P – прогнозируемая вероятность (1 – ИКМП, 0 – ИБС без ИКМП).

Данная формула была статистически значимой ($p=0,005$) и позволяла верно дифференцировать форму ИБС (с ИКМП или без ИКМП) у 81,3% больных; чувствительность модели составила 85,7%, специфичность – 77,8%. Это позволяет ее рекомендовать для применения в клинической практике. Так как чувствительность модели превышала ее специфичность, то она больше подходит для выявления среди больных ИБС группы риска по развитию ИКМП, чем для уточнения диагноза ИКМП.

Таким образом, настоящее исследование установило, что при ИБС, осложненной ИКМП, формируется нехарактерный для атерогенеза субпопуляционный состав моноцитов крови с дефицитом неклассических клеток, который обусловлен нарушением баланса медиаторов крови – IL-10, галектина-3 и M-CSF. Выявленные закономерности

развития ИКМП демонстрируют мишени для ее молекулярно-клеточной таргетной терапии и критерии лабораторной диагностики, которые помогут зарегистрировать развитие этого заболевания еще до наступления необратимой перестройки миокарда и дилатации левого желудочка.

ВЫВОДЫ

1. При ишемической болезни сердца (ИБС), неосложненной ишемической кардиомиопатией (ИКМП), снижение количества классических $CD14^{++}CD16^{-}$ и переходных $CD14^{+}CD16^{-}$ моноцитов сочетается с увеличением числа промежуточных $CD14^{++}CD16^{+}$ клеток при сопоставимом с нормой содержании неклассических $CD14^{+}CD16^{++}$ моноцитов в крови.
2. При ИКМП содержание $CD14^{++}CD16^{-}$, $CD14^{++}CD16^{+}$ и $CD14^{+}CD16^{-}$ моноцитов в крови не отклоняется от нормы. При этом имеется дефицит неклассических клеток, взаимосвязанный с увеличением конечного диастолического индекса и массы миокарда левого желудочка.
3. По данным дисперсионного анализа, на численность неклассических и классических моноцитов в крови при ИКМП влияет повышенное содержание ИЛ-10 и галектина-3 соответственно при нормальной концентрации М-CSF в плазме крови. При ИБС без ИКМП концентрация ИЛ-10 и галектина-3 в крови соответствует норме; плазменная концентрация М-CSF снижена и зависит от численности классических моноцитов в крови.
4. У больных ИБС вне зависимости от развития ИКМП определяется обратное соотношение между количеством классических и промежуточных моноцитов в крови, и между содержанием неклассических моноцитов в крови и степенью стеноза коронарных артерий. При этом увеличение концентрации TNF- α сочетается с недостаточностью IFN- γ и ИЛ-4 при сопоставимом с нормой уровне ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови.
5. Различия нарушений субпопуляционного состава моноцитов и баланса иммунорегуляторных медиаторов в крови у больных ИБС с ИКМП и без ИКМП определяются при сходных значениях функционального класса стенокардии и сердечной недостаточности, но у больных ИКМП (в сравнении с больными без ИКМП) при более высоком конечном диастолическом индексе и большей массе миокарда левого желудочка (в 5,0 и 1,25 раза соответственно), меньшей частоте встречаемости сахарного диабета типа 2 (в 4,8 раза) и более частых хронических нарушениях мозгового кровообращения (в 1,5 раза).
6. По данным многофакторного анализа, в основе формирования ИКМП при ИБС лежат два патогенетических фактора: первый связан с концентрацией иммуносупрессорного ИЛ-10 (положительно) и численностью неклассических и переходных моноцитов (отрицательно) в крови, второй – с концентрацией факторов дифференциации макрофагов TNF- α и М-CSF в плазме крови (отрицательно).
7. Комплексное определение концентрации галектина-3 (ее увеличение) и количества неклассических моноцитов (его снижение) в крови позволяет дифференцировать ИКМП у больных ИБС с точностью классификации 81,2%, чувствительностью 85,7% и специфичностью 77,8%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Субпопуляционный состав моноцитов крови и костного мозга у больных с хронической сердечной недостаточностью / Винс М.В., Чумакова С.П., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Бармина С.Э., Вернер М.Д., Новицкий В.В. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2018. – Т.17, №4. – С. 16-22. Импакт-фактор РИНЦ 0,643. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-16-22
2. Интерлейкины 4 и 6 как факторы модуляции субпопуляционного состава моноцитов крови у больных ишемической кардиомиопатией // Азарова Д.А., Чумакова С.П., Уразова О.И., Винс М.В., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Новицкий В.В. // **Казанский медицинский журнал.** – 2018. – Т.99, №6. – С. 900-905. Импакт-фактор РИНЦ 0,503. DOI: 10.17816/КМЖ2018-900
3. Субпопуляционный состав моноцитов крови у больных ишемической кардиомиопатией / Чумакова С.П., Винс М.В., Азарова Д.А., Уразова О.И., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Новицкий В.В. // В сб.: Сб. «VI Евразийский конгресс кардиологов. Москва, 18-19 апреля 2018 г. – Сборник тезисов». – М.: ООО «ИнтерМедсервис», 2018. – С. 67-68.
4. Субпопуляционный состав моноцитов крови и костного мозга у больных с хронической сердечной недостаточностью / Винс М.В., Чумакова С.П., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Новицкий В.В. // Сб. «Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий», г. Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г. – СПб., 2018. – С. 125. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-16-22
5. Субпопуляции моноцитов крови у больных с генерализованной гипоксией / Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Кошель А.П., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Гарганеева Н.П., Новицкий В.В. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2019. – Т.18, №1. – С. 277-285. Импакт-фактор РИНЦ 0,643. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-277-285
6. Влияние интерлейкина-10 на субпопуляционный состав моноцитов крови при ишемической кардиомиопатии / Винс М.В., Майнагашева Е.С., Новицкий В.В., Погонченкова Д.А., Пряхин А.С., Уразова О.И., Чумакова С.П., Шипулин В.М. // Сб.: «Российский национальный конгресс кардиологов: РКО для профессионалов и пациентов – от первичной помощи к новейшим технологиям, Екатеринбург, 24-26 сентября 2019 года: Материалы конгресса». – Екатеринбург, 2019. – С. 437.
7. Особенности субпопуляционного состава моноцитов крови и содержания гипоксией индуцируемого фактора-1альфа у больных ишемической кардиомиопатией / Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Майнагашева Е.С., Погонченкова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Новицкий В.В. // **Евразийский кардиологический журнал.** – №S2. – 2019. – С. 282-283. Импакт-фактор РИНЦ 0,409.
8. Субпопуляционный состав моноцитов крови при заболеваниях, сопряженных с гипоксией / Винс М.В., Чумакова С.П., Уразова О.И., Крук Е.А., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Майнагашева Е.С., Погонченкова Д.А., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Новицкий В.В. // Сб.: «Материалы научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и патологии», посвящённой 130-летию кафедры физиологии Сибирского

государственного медицинского университета и Томского государственного университета, Томск, 23-24 мая 2019». – Томск, 2019. – С. 37-39.

9. CD14⁺CD16⁻ клетки как самостоятельная субпопуляция моноцитов / Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Погонченкова Д.А., Шипулин В.М., Майнагашева Е.С., Вернер М.Д., Елин М.А., Новицкий В.В. // **Лабораторная служба.** – 2019. – Т.8, №1. – С. 63. Импакт-фактор РИНЦ 0,214.

10. Ишемическая кардиомиопатия: моноциты крови и медиаторы их дифференциации / Чумакова С.П., Шипулин В.М., Уразова О.И., Погонченкова Д.А., Винс М.В., Пряхин А.С., Колобовникова Ю.В., Чурина Е.Г., Новицкий В.В.// **Вестник Российской академии медицинских наук.** – 2019. – №6. – С. 396-404. Импакт-фактор РИНЦ 1,436. DOI: 10.15690/vramn1185

11. Интерлейкины 4 и 10 как факторы дифференцировки субпопуляций моноцитов крови при ишемической кардиомиопатии / Чумакова С.П., Погонченкова Д.А., Уразова О.И., Винс М.В., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Новицкий В.В. // **Клиническая физиология кровообращения.** – 2020. – Т.17, №1. – С. 52-57. Импакт-фактор РИНЦ 0,342. DOI:10.24022/1814-6910-2020-17-152-57

12. Дисбаланс цитокинов и численность неклассических моноцитов в крови при сердечной недостаточности ишемического генеза / Шипулин В.М., Чумакова С.П., Погонченкова Д.А., Уразова О.И., Винс М.В., Пряхин А.С., Новицкий В.В. // **Патология кровообращения и кардиохирургия.** – 2020. – Т.24, №1. – С. 45-53. Импакт-фактор РИНЦ 0,490. DOI: 10.21688/1681-3472-2020-1-45-53

13. Differential clinical and laboratory signs of ischemic cardiomyopathy / Chumakova S.P., Urazova O.I., Pogonchenkova D.A. // Proceedings of the International Conference «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration». Part 1 – Reports in English», Beijing, China, 30 December 2020. – М.: Infiniti, 2020. – P. 125-132. DOI: 10.34660/INF.2020.54.15.014

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИКМП – ишемическая кардиомиопатия

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

CD – cluster of differentiation (кластер дифференциации)

IFN – interferon (интерферон)

IL – interleukin (интерлейкин)

GM-CSF – granulocyte and macrophage colony-stimulating factor (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов)

M-CSF – macrophage colony-stimulating factor (колониестимулирующий фактор макрофагов)

NYHA – New York Heart Association

TGF – transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)

Th – T-helper (Т-хелпер)

TNF – tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)