

# Взаимосвязь уровня миелоидных дендритных клеток и концентрации хемокина CCL17 с тяжестью атеросклероза коронарных артерий

А. М. Карпов, А. В. Рвачева, У. В. Чубыкина, В. П. Масенко, В. Г. Наумов

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ, г. Москва

## Абстракт

**Цель исследования:** в исследовании изучалась взаимосвязь уровней содержания в периферической крови миелоидных дендритных клеток и хемокина CCL17 с тяжестью атеросклеротического поражения коронарных артерий и наличием гемодинамически значимых стенозов коронарных артерий. Оценивалось влияние воспалительной реакции, возникающей в ответ на имплантацию коронарного стента, на уровни МДК и CCL17.

**Материалы и методы:** было обследовано 82 пациента мужского пола, которым проводилась диагностическая коронарография, и 10 здоровых добровольцев. Выделено 4 группы в зависимости от тяжести коронарного атеросклероза. Также проводилось разделение всех пациентов на 2 группы в зависимости от наличия гемодинамически значимых стенозов коронарных артерий. Всем пациентам проводилось определение общего количества миелоидных дендритных клеток методом цветной проточной цитофлюориметрии, хемокина CCL17 методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич».

**Результаты:** достоверных взаимосвязей между уровнями содержания в крови миелоидных дендритных клеток и хемокина CCL17 с тяжестью течения коронарного атеросклероза выявлено не было. Больные ИБС с наличием гемодинамически значимых стенозов коронарных артерий характеризовались более низким уровнем миелоидных дендритных клеток.

**Ключевые слова:** атеросклероз, воспаление, дендритные клетки, хемокин CCL17.

## The relationship between myeloid dendritic cells CC chemokine CCL17 concentrations with the severity of coronary atherosclerosis.

A. M. Karpov, A. V. Rvacheva, U. V. Chubykina, V. P. Masenko, V. G. Naumov

Russian Cardiology Research Complex, Moscow, Russia

## Abstract

**Aim.** The study explored the association between circulating myeloid dendritic cells and chemokine CCL17 with the severity of coronary atherosclerosis and the presence of hemodynamically significant stenoses of the coronary arteries. The effects of the inflammatory response, which occurs in response to the implantation of a coronary stent, in the levels of CCL17 and MDC were also evaluated.

**Materials and Methods.** The study involved 82 male patients, who underwent coronary angiography and 10 healthy individuals. Patients were divided into 4 groups based on the severity of coronary atherosclerosis. In addition, all patients were divided into 2 groups according to the presence of hemodynamically significant stenoses of the coronary arteries. The severity of atherosclerotic coronary lesions was evaluated using the Gensini score. All patients underwent determination of circulating myeloid dendritic cells in the peripheral blood by flow cytometry, chemokine CCL17 by quantitative Sandwich ELISA.

**Results.** No significant relationships between the levels in blood myeloid dendritic cells and chemokines CCL17 with severity of coronary atherosclerosis were identified. CHD patients with hemodynamically significant stenoses of the coronary arteries were characterized by lower levels of myeloid dendritic cells.

**Keywords:** atherosclerosis, inflammation, dendritic cells, chemokine CCL17.

Неуклонный рост смертности от ишемической болезни сердца, главным патоморфологическим субстратом которой является атеросклероз коронарных артерий, вынуждает ученых искать новые способы профилактики, диагностики и лечения этого заболевания. В настоящее время не вызывает сомнений, что важнейшую роль в развитии и прогрессировании атеросклероза играет иммунное воспаление. Многочисленные исследования в данном направлении позволили идентифицировать различные типы иммунокомпетентных клеток, принимающих участие в процессах возникновения, роста и дестабилизации атеросклеротических бляшек. К ним относятся прежде всего моноциты, Т- и В-лимфоциты, тучные клетки.

В 1995 г. в стенках артерий был обнаружен еще один вид клеток иммунной системы – дендритные клетки (ДК) [1]. Дендритные клетки – это гетерогенная популяция антигенпрезентирующих клеток костномозгового происхождения, основными функциями которых являются поглощение различных патогенов и представление их Т-лимфоцитам в качестве антигенов. Известно, что во всех тканях и во всех патологических ситуациях ДК представляют только минорную клеточную популяцию, не превышающую одного-двух процентов. Несмотря на малочисленность, ДК являются высокоэффективными клетками. Установлено, что одна ДК способна активировать больше тысячи лимфоцитов, что позволяет ДК регулировать иммунные процессы, происходящие в организме. Сегодня имеются убедительные доказательства участия миелоидного подтипа дендритных клеток (мДК) в иммуновоспалительном процессе при атеросклерозе [2]. Так, в настоящее время известно, что мДК, расположенные в артериальной стенке, способны захватывать частицы окисленных липопротеидов низкой плотности (окс-ЛПНП) и представлять их на своей поверхности в качестве антигена для нативных Т-хелперных клеток. Процесс антиген-презентации происходит в региональной лимфоидной ткани и непосредственно в атеросклеротической бляшке. Для привлечения Т-хелперов к местам расположения дендритных клеток последние экспрессируют хемокин CCL17, взаимодействующий с Т-клеточными рецепторами CCR4 [3]. После распознавания ox-LDL как антигена нативные Т-хелперы дифференцируются в Т-хелперы 1 типа (Th-1). Главная роль в этом процессе принадлежит ИЛ-12, продуцируемому дендритными клетками [4]. В конечном итоге Th-1 проникают внутрь сосудистой стенки и стимулируют активацию макрофагов и формирование пенных клеток.

Несомненно, дендритные клетки являются специализированными и наиболее мощными антиген-презентирующими клетками человеческого организма, с помощью которых можно получить направленный иммунный ответ. На сегодняшний день рассматривается возможность использования ДК для иммунотерапии атеросклероза.

Иммуновоспалительные реакции при атеросклерозе изучаются уже давно, однако ученые до сих пор продолжают обнаруживать новые звенья атерогенеза. Более детальное исследование роли дендритных клеток, их хемокина CCL17, возможно, позволит глубже понять патогенез заболевания и разработать более эффективные методы его профилактики и лечения.

### Цель исследования

Изучить взаимосвязь уровней содержания в периферической крови миелоидных дендритных клеток и хемокина CCL17 с тяжестью атеросклеротического поражения стенозов коронарных артерий и наличием гемодинамически значимых стенозов коронарных артерий. Изучить влияние воспалительной реакции, возникающей в ответ на проведение эндоваскулярного вмешательства с имплантацией коронарного стента, на уровни мДК и CCL17.

### Материалы и методы

В исследование было включено 82 пациента мужского пола, находившихся на лечении в клинических отделениях РКНПК им. А.Л. Мясникова, имевших показания для проведения коронарной ангиографии, и 10 молодых здоровых добровольцев без клинических признаков наличия ИБС. Критериями исключения служили: ОКС, инфаркт миокарда, ОНМК или оперативные вмешательства в предшествующие 6 месяцев, злокачественные новообразования, сахарный диабет I и II типов, наличие системных воспалительных или инфекционных заболеваний, прием иммунотропной терапии.

Всем пациентам, находившимся на стационарном лечении, проводилось общеклиническое обследование, включавшее в себя сбор жалоб, данных анамнеза и физическое обследование. Кроме того, пациентам, находившимся на стационарном лечении, проводилась коронарография. Тяжесть атеросклеротического поражения коронарного русла была оценена при помощи индекса Gensini. Клеточное иммунофенотипирование проводили методами прямого и бокового светорассеяния и цитофлуориметрии в потоке. Для исследования дендритных клеток применялись антитела CD(14+16)/CD85k/CD33 (Beckman Coulter, США). Пробы обрабатывали на станции пробоподготовки TQ-prep (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов Immunoprep (Beckman Coulter, США). Анализ связывания антител с клетками выполняли на поточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США). Содержание хемокина CCL-17 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием наборов Human CCL17/TARC Quantikine ELISA Kit (RnDSystems, США).

Все включенные в исследование пациенты были разделены на 4 группы по квартилям в зависимости

**Таблица 1.** Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	Группа 1 Здоровые добровольцы (n = 10)	Группа 2 Интактные или мало- измененные КА (n = 12)	Группа 3 Умеренный атеросклероз КА (n = 46)	Группа 4 Тяжелый атеросклероз КА (n = 24)	P
Возраст	26,5 (25,0–31,0)	56,0 (46,0–58,5)	61,0 (54,0–66,0)	62,5 (55,0–69,0)	$p_{1-2} = 0,0002$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{1-4} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,0002$ $p_{2-4} = 0,0345$
ИМТ	25,2 (24,8–26,2)	31,8 (28,3–35,5)	27,6 (24,8–30,4)	29,4 (27,4–32,8)	$p_{1-2} = 0,0019$ $p_{1-3} = 0,0408$ $p_{1-4} = 0,0001$ $p_{2-3} = 0,0442$
АГ	–	10 (83%)	38 (83%)	19 (79%)	0,9225
Семейный анамнез	7 (70%)	6 (50%)	30 (65%)	16 (67%)	0,7562
Курение	5 (50%)	8 (67%)	31 (67%)	16 (67%)	0,7840
ИМ в анамнезе	–	1 (8%)	9 (20%)	3 (13%)	0,7019
ТБКА в анамнезе	–	–	22 (48%)	7 (29%)	0,1052

Примечание: АГ – артериальная гипертония; ИМТ – индекс массы тела; ИМ – инфаркт миокарда; КА – коронарный атеросклероз; ТБКА – транслюминальная баллонная ангиопластика коронарных артерий.

от значения индекса Gensini score. В первую группу (n = 12) вошли пациенты с интактными и малоизмененными коронарными артериями, у которых значение индекса соответствовало 0,25-квартилю (<1,5). Пациенты с умеренным коронарным атеросклерозом, у которых значение индекса Gensini score входило в межквартильный интервал (значение Gensini score 1,5–40), сформировали вторую группу (n = 46). Третью группу составили пациенты с тяжелым атеросклеротическим поражением коронарного русла со значением индекса Gensini score >40, что соответствует 0,75-квартилю (n = 24). Четвертую группу составили 10 здоровых добровольцев молодого возраста, без клинических признаков ИБС. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1. На момент включения в исследование пациенты, находившиеся на стационарном лечении, получали стандартную для больных ИБС терапию.

Для изучения влияния воспалительной реакции, возникающей при имплантации коронарных стентов, на уровень содержания в крови дендритных клеток и на концентрацию хемокина CCL17 из общего числа пациентов дополнительно было обследовано 22 больных со стенозирующим коронарным атеросклерозом, которым проводилась ангиопластика со стентированием коронарных артерий.

Статистическая обработка проводилась при помощи пакета программ Statistica 6,0. Так как большинство сравниваемых признаков не имело нормального распределения, все данные представлены в виде медианы, 0,25- и 0,75-квантилей, а различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Для анализа данных в трех независимых группах использовался метод ANOVA по Краскалу–Уоллису. При исследовании динамики показателей относительно исходных уровней использовался W-критерий Уилкоксона.

## Результаты и обсуждение

При множественном межгрупповом сравнении абсолютного и относительного уровней содержания мДК в периферической крови достоверных различий между группами выявлено не было. Однако при дальнейшем попарном сравнении групп было выявлено, что у больных с тяжелым коронарным атеросклерозом отношение количества мДК к общему числу мононуклеаров в крови оказалось достоверно ниже, чем у больных с умеренным атеросклерозом коронарных артерий (табл. 2). Необходимо отметить, что наиболее высокий уровень мДК наблюдался в группе здоровых добровольцев,

**Таблица 2.** Сравнение уровня дендритных клеток в крови больных с различной степенью выраженности коронарного атеросклероза и у молодых здоровых добровольцев

Показатель	Группа 1 Здоровые добровольцы (n = 10)	Группа 2 Интактные или мало- изменен- ные КА (n = 12)	Группа 3 Умеренный атеросклероз КА (n = 46)	Группа 4 Тяжелый атеросклероз КА (n = 24)	P
мДК, кл/мкл	19,00 (12,0–22,0)	14,0 (12,0–21,5)	18,00 (12,0–21,0)	12,00 (8,00–18,00)	0,18
мДК, %	5,97 (2,96–9,19)	6,92 (5,60–8,02)	6,12 (4,70–8,36)	5,52 (3,80–7,94)	p3/4=0,04

Примечание: КА – коронарный атеросклероз; мДК – миелоидные дендритные клетки.

**Таблица 3.** Сравнение уровня дендритных клеток в крови пациентов с наличием гемодинамически значимых стенозов КА и без

Показатель	Нестенозирующий атеросклероз КА n = 27	Стенозирующий атеросклероз КА n = 65	P
мДК	18,71 (±2,13)	14,22 (±1,04)	0,0380
мДК, %	6,38 (5,56–8,38)	5,71 (3,94–8,26)	0,4376

Примечание: КА – коронарный атеросклероз; мДК – миелоидные дендритные клетки.

наиболее низкий – в группе больных с тяжелым атеросклеротическим поражением коронарного русла. Группа пациентов с интактными или малоизмененными коронарными артериями характеризовалась более низким уровнем мДК по сравнению с группой больных с умеренным коронарным атеросклерозом. Несмотря на то, что различия между группами не достигли статистически значимых различий, прослеживается тенденция к снижению уровня миелоидных дендритных клеток с нарастанием тяжести атеросклероза коронарных артерий. Согласно результатам исследования Yilmaz A. (2006) [5], у пациентов без коронарного атеросклероза в крови отмечается более высокая концентрация мДК по сравнению с больными ИБС. Данный факт может быть объяснен тем, что для осуществления антиген-презентации дендритные клетки мигрируют в регионарную лимфоидную ткань или в толщу АСБ. Наши наблюдения частично согласуются с данными вышеуказанного исследования.

Низкий уровень содержания мДК в крови пациентов группы с интактными или малоизмененными коронарными артериями может быть обусловлен тем, что мы не проводили поиск атеросклеротически поврежденных сосудов некоронарной локализации. При этом всем пациентам данной группы диагностическая коронарография проводилась исключительно по показаниям (наличие болей в грудной клетке, по характеру напоминающих стенокардию, наличие факторов риска развития ИБС, отсутствие

возможности исключения атеросклероза коронарных артерий другими методами).

При разделении всех пациентов на две группы в зависимости от наличия гемодинамически значимых (>50%) стенозов коронарных артерий в группе больных со стенозирующим поражением коронарного русла отмечался достоверно более низкий уровень мДК. Отношение количества мДК к общему числу мононуклеаров периферической крови в группах достоверно не различалось (табл. 3). Однако, учитывая, что дендритные клетки являются минорной популяцией, этот показатель может не отражать функциональную роль дендритных клеток в иммуновоспалительном процессе.

Анализ данных, представленных в табл. 4, продемонстрировал отсутствие статистически значимых различий между группами здоровых добровольцев, пациентов с интактными или малоизмененными коронарными артериями, больных с умеренным и тяжелым коронарным атеросклерозом по уровню содержания хемокина ССЛ17. Необходимо отметить, что наиболее низкий уровень ССЛ17 наблюдался в группе здоровых добровольцев, наиболее высокий – в группе больных с тяжелым атеросклерозом коронарных артерий. Пациенты с интактными или малоизмененными коронарными артериями характеризовались несколько более высоким уровнем ССЛ17 по сравнению с больными с умеренным атеросклеротическим поражением коронарного русла. Подобная тенденция наблюдалась

**Таблица 4.** Сравнение уровня хемокина CCL17 в крови больных с различной степенью выраженности коронарного атеросклероза и у молодых здоровых добровольцев

Показатель	Группа 1 Здоровые добровольцы (n = 10)	Группа 2 Интактные или малоизмененные КА (n = 12)	Группа 3 Умеренный атеросклероз КА (n = 46)	Группа 4 Тяжелый атеросклероз КА (n = 24)	P
CCL17 пг/мл	231,49 (167,67–268,74)	264,95 (210,26–320,65)	255,79 (204,12–375,77)	310,36 (226,57–408,09)	0,43

Примечание: КА – коронарный атеросклероз.

**Таблица 5.** Содержание хемокина CCL17 в крови пациентов с наличием гемодинамически значимых стенозов КА и без

Показатель	Пациенты n = 92		P
	Нестенозирующий атеросклероз КА n = 27	Стенозирующий атеросклероз КА n = 65	
CCL17 пг/мл	262,09 (211,79–357,67)	266,53 (200,75–373,60)	0,8605

Примечание: КА – коронарный атеросклероз.

**Таблица 6.** Динамика уровней содержания в крови миелоидных дендритных клеток и хемокина CCL17 через сутки после проведения ангиопластики со стентированием коронарных артерий

Показатель	Исходно	Через сутки после КС	P
мДК	16,00 (9,00–21,00)	17,00 (13,00–23,00)	0,0468
мДК, %	5,69 (3,31–7,26)	6,60 (4,63–7,83)	0,0245
CCL17 пг/мл	240,75 (192,48–292,98)	267,90 (213,08–316,32)	0,0190

Примечание: КА – коронарный атеросклероз; мДК – миелоидные дендритные клетки.

при анализе уровня содержания в периферической крови дендритных клеток. При сравнении групп больных, в зависимости от наличия атеросклеротических бляшек, сужающих просвет коронарных артерий более чем на 50%, достоверных различий также не было выявлено (табл. 5). Полученные нами данные частично согласуются с результатами исследования Ye Y., 2015 [6], в котором на основании анализа образцов крови 971 пациента было показано, что уровень хемокина CCL17 ассоциирован с тяжестью атеросклероза. Известно, что имплантация стента приводит к повреждению эндотелия и развитию локального иммунного ответа, системными проявлениями которого является повышение маркеров воспаления [7–9]. Мы проводили анализ образцов венозной крови, взятой накануне и через сутки после завершения процедуры коронарного стентирования. Результаты анализа представлены в табл. 6. Было выявлено достоверное повышение абсолютного количества миелоидных дендритных клеток, процентного отношения количества мДК

к общему числу мононуклеаров периферической крови, а также концентрации хемокина CCL17.

Полученные нами данные указывают на участие миелоидных дендритных клеток в иммунном ответе, возникающем в ответ на повреждение эндотелия при коронарном стентировании.

## Заключение

Результаты многочисленных экспериментальных и единичных клинических работ говорят о важной роли дендритных клеток в развитии и прогрессировании атеросклероза. Полученные нами данные свидетельствуют об участии миелоидных дендритных клеток и хемокина CCL17 в иммуновоспалительном процессе у больных с коронарным атеросклерозом. При этом отмечена тенденция к снижению уровня содержания мДК и увеличению концентрации CCL17 по мере усугубления тяжести атеросклероза коронарных артерий.

## Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

## Список литературы

1. Bobryshev YV, Lord RS. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol.* 1995;58(3):307-22.
2. Shi H, Ge J, Fang W, Yao K, Sun A, Huang R, Jia Q, Wang K, Zou Y, Cao X. Peripheral-blood dendritic cells in men with coronary heart disease. *Am J Cardiol.* 2007;100(4):593-7.
3. Weber C, Meiler S, Döring Y, Koch M, Drechsler M, Megens RT, Rowinska Z, Bidzbekov K, Fecher C, Ribechini E, van Zandvoort MA, Binder CJ, Jelinek I, Hristov M, Boon L, Jung S, Korn T, Lutz MB, Förster I, Zenke M, Hieronymus T, Junt T, Zernecke A. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2898-910.
4. Lee TS, Yen HC, Pan CC, Chau LY. The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:734-42.
5. Yilmaz A, Weber J, Cicha I, Stumpf C, Klein M, Raitbel D, Daniel WG, Garlichs CD. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(1):70-80.
6. Ye Y, Yang X, Zhao X, Chen L, Xie H, Zeng Y, Shen Z, Fan Z, Liu Z, Zhang S. Serum chemokine CCL17/thymus activation and regulated chemokine is correlated with coronary artery diseases. *Atherosclerosis.* 2015;238(2):365-9.
7. Saleh N, Svane B, Hansson LO, Jensen J, Nilsson T, Danielsson O, Tornvall P. Response of serum C-reactive protein to percutaneous coronary intervention has prognostic value. *Clin Chem.* 2005;51(11):2124-30.
8. Park DW, Hong MK, Sub IW, Hwang ES, Lee SW, Jeong YH, Kim YH, Lee CW, Kim JJ, Park SW, Park SJ. Results and predictors of angiographic restenosis and long-term adverse cardiac events after drug-eluting stent implantation for aorto-ostial coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2007;99(6):760-5.
9. Delhaye C, Maluenda G, Wakabayashi K, Ben-Dor I, Lemesle G, Collins SD, Syed AI, Torguson R, Kaneshige K, Xue Z, Suddath WO, Satler LF, Kent KM, Lindsay J, Picard AD, Waksman R. Long-term prognostic value of preprocedural C-reactive protein after drug-eluting stent implantation. *Am J Cardiol.* 2010;105(6):826-32.