

Характеристика иммунного ответа у больных ишемической болезнью сердца в отдаленные сроки после операции коронарного шунтирования
Хлопина И.А., Шацова Е.Н., Добродеева Л.К.
Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

Резюме. В статье представлены результаты исследования уровня иммунного ответа по содержанию субпопуляций лимфоцитов, ЦИК, показателей фагоцитоза и цитокинов. Проведен сравнительный анализ иммунного ответа в группе мужчин, перенесших операцию коронарного шунтирования и в контрольной группе без клинических признаков ИБС. Выявлены признаки активизации клеточного и гуморального звеньев иммунитета и фагоцитоза. Снижение концентрации TNF- α , повышение уровней ИЛ-2, индексов CD₂₅/CD₉₅ и HLADR/CD₉₅ в крови больных могут быть маркерами иммунного ответа организма на хроническое «неосложненное» течение ИБС после эффективной реваскуляризации миокарда.

Ключевые слова: коронарное шунтирование, реваскуляризация, иммунное воспаление, цитокины.

Современное понимание патогенеза атеросклероза выдвигает на первое место роль иммунного воспаления, подобного реакции гиперчувствительности замедленного типа [5]. Доказано, что начальные этапы иммунного ответа связаны с модифицированными липопротеинами низкой плотности (ЛПНП), выступающими в качестве антигенов с последующей активизацией мононуклеаров и их адгезией на эндотелии сосудов, развитием локального воспаления и повреждения [1, 2].

В качестве механизмов иммунного повреждения при ИБС выявлены антителозависимый цитолиз, цитотоксичность лимфоцитов, патогенное воздействие циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), дисрегуляция активности апоптоза [3]. Отдельные признаки подобных иммунных нарушений обнаружены у 10 - 30% жителей Севера в возрасте 40-60 лет, что позволяет констатировать в регионе специфический преморбидный фон для развития сосудистых заболеваний [4].

Создание в г. Архангельске Центра кардиохирургии, высокая доступность и успешное осуществление операций коронарного шунтирования (КШ) как в условиях искусственного кровообращения, так и на работающем сердце обусловили актуальность изучения состояния иммунной реактивности в отдаленные сроки после реваскуляризации миокарда. Возможно, достоверная динамика отдельных показателей иммунного ответа позволит расширить круг прогностических показателей течения ИБС после операции КШ.

Методика исследования

Иммунологическое исследование проведено в институте физиологии природных адаптаций УроРАН у 100 мужчин в возрасте 50 - 65 лет, в т.ч. у 20 пациентов в отдаленные сроки после операции КШ и у 80 практически здоровых людей без клинических признаков ИБС и артериальной гипертонии. Средний возраст больных ИБС на момент операции составил $55,5 \pm 5,88$ лет, длительность заболевания от 1 до 20 лет, у 60% она не превышала 5 лет. Операция прямой реваскуляризации выполнена в условиях искусственного кровообращения. Тяжелое 3-х сосудистое поражение коронарных артерий выявлено у 85% больных ИБС, 2-3 шунта выполнены у 50% пациентов, у остальных 4 и более шунтов. Артериальная гипертония диагностирована у 80% больных, в сочетании с избыточным весом или ожирением – у 70%. Курили 45% обследованных. Отягощенная наследственность по ИБС обнаружена у 65%. Мультифокальное поражение атеросклерозом на момент иммунологического исследования выявлено у 15% больных.

Забор крови на исследование проводился в асептических условиях из локтевой вены утром натощак. Содержание лейкоцитов и количество клеток в периферической крови (лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов) определяли стандартными методами. Для оценки состояния фагоцитарного звена иммунитета изучали фагоцитарный показатель и фагоцитарное число с применением латекса производства современной лаборатории ДиаэМ (Москва). Для определения уровней ЦИК использовали диагностические наборы химической компании «Реакомплекс» (Россия). Применялся метод нефелометрии различной растворимости мономеров иммуноглобулинов в составе иммунных комплексов при наличии в среде полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000). Субпопуляции Т-лимфоцитов определяли методом непрямой иммунопероксидазной реакции на препаратах лимфоцитов типа «высушенная капля» с использованием моноклеарных антител производства НПЦ «Медбиоспектр» (Москва). Цитокин интерлейкин-2 (ИЛ-2) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (Biosource, Бельгия). Для определения антител к кардиолипину использовали непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (Orgentec, Германия). Цитокин фактор некроза опухоли- α (TNF- α) определяли методом «конкурентного» иммуноферментного анализа (Biosource, Бельгия).

Результаты исследования обработаны в статистической программе «STATISTICA 6.0». Нормально распределенные количественные признаки представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($M \pm S.D.$). Количественные признаки, не имеющие нормального распределения, обозначены как медиана (первый и

третий квартиль). Нормальность распределения определяли по критерию Колмогорова-Смирнова и Льюллиефорса. Достоверность различий в двух не связанных группах определяли по t-критерию Стьюдента и критерию непараметрической статистики Манна – Уитни, в трех – по результатам дисперсионного анализа по Краскеллу-Уоллису. Использовался корреляционный анализ Пирсона (для нормального распределения) и Спирмена (для прочих).

Результаты исследования и обсуждение

Иммунологическое исследование проведено через 1,5 - 5 лет после операции реваскуляризации миокарда. Сравнение уровней большинства изучаемых показателей в зависимости от числа лет после операции выявило однонаправленную тенденцию их изменений без достоверных различий среди группы наблюдения (рис.1). Это позволило всех больных объединить в одну опытную группу.

Средние значения показателей гемограмм, фагоцитоза, фенотипов лимфоцитов и ЦИК представлены в табл.1, цитокинов и антител к кардиолипину – в табл.2.

Получены признаки активизации всех звеньев иммунной системы. У больных ИБС достоверно увеличено содержание лейкоцитов за счет возрастания уровня нейтрофилов. Содержание лимфоцитов в абсолютном выражении не изменилось, а в процентном – имело тенденцию к снижению. Значительно почти в 2 раза увеличение содержания моноцитов как в абсолютном выражении, так и в процентах, сочеталось с таким же уровнем возрастанием фагоцитарного числа. Если содержание активных фагоцитов у больных ИБС меньше и у 70% из них ниже допустимого физиологического значения (менее 50%), то количество поглощенных частиц одним нейтрофилом почти вдвое превышало группу сравнения. Можно предположить, что резервы неспецифической резистентности у больных ИБС сохранены.

Выявлены признаки активации клеточного звена иммунного ответа. Так, у больных ИБС достоверно возросли уровни лимфоцитов, содержащих альфа-субъединицу рецептора для ИЛ-2 - CD₂₅ (ранний маркер активации лимфоцитов), лимфоцитов HLADR с рецепторами антигенов гистосовместимости класса II (поздний маркер активации лимфоцитов). При этом содержание иммунорегуляторных лимфоцитов - CD₄, цитотоксических CD₈, естественных киллеров - CD₁₆ осталось близким содержанию в группе сравнения. Индекс CD₄/CD₈ вырос у больных ИБС до 1,7±0,02 против 1,1±0,09 (p<0,05) в группе сравнения, что указывает на преобладание реакций активизации иммунного ответа против аутоантигенов [7]. Другим доказательством аутоенсибилизации у больных ИБС является присутствие антител к кардиолипину, относящихся

к группе антител к фосфолипидам, хотя уровень их содержания не отличается от уровня в группе сравнения. Наконец обращает на себя внимание значительный рост у больных ИБС уровня продукции провоспалительного цитокина ИЛ-2 наряду с достоверным увеличением содержания субпопуляции лимфоцитов, несущих рецептор к ИЛ-2. Известно, что ИЛ-2 играет основную роль в регуляции дифференцировки лимфоцитов и пролиферации Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров [5]. Закономерно, что у больных ИБС выявлены высокие, близкие к токсическим, концентрации ЦИК как с IgA, так и с IgM, достоверно превышающие таковые в группе сравнения, что также, как и присутствие аутоантител к кардиолипину, указывает на активизацию гуморального иммунного ответа.

В тоже время не получены доказательства активизации Fas-зависимого апоптоза. Уровень содержания TNF- α превышал физиологический уровень (>50 пг/мл) всего у 5% обследованных больных ИБС и составил в среднем 14,75 пг/мл (5,26 – 18,92), не отличаясь от уровня в группе сравнения – $14,15 \pm 3,68$ пг/мл ($p > 0,05$). Не выявлено достоверных отличий и в содержании субпопуляции лимфоцитов с рецептором к TNF- α - CD₉₅ – $0,40 \pm 0,08 \times 10^9$ /л против $0,44 \pm 0,04$ в группе сравнения ($p > 0,05$). Индексы CD₂₅/CD₉₅ и HLADR/CD₉₅, т.е. расчет соотношений маркеров активизации и маркера апоптоза Т-лимфоцитов у больных ИБС в наших наблюдениях составил $1,7 \pm 0,08$ против $1,1 \pm 0,02$ ($p < 0,01$) и $1,8 \pm 0,03$ против $1,1 \pm 0,03$ ($p < 0,01$), что косвенно указывает на преобладание воспалительного компонента иммунного ответа и ограничение Fas-опосредованной гибели клеток активированных лимфоцитов [7].

Полученные результаты свидетельствуют, что у больных в отдаленные сроки после операции КШ формируется специфический иммунный ответ с Т-лимфоцитзависимым механизмом активизации иммунного воспаления в сосудистой стенке, который поддерживается саморегуляцией продукции провоспалительных цитокинов с активным синтезом ИЛ-2. С точки зрения многих авторов [5, 6, 8] подобный вариант иммунного ответа характерен для развития хронической коронарной патологии при минимальных изменениях коронарных артерий у больных ИБС. В наших наблюдениях эффективность реваскуляризации подтверждалась положительной динамикой коронарного синдрома и функционального состояния миокарда.

Для хронического течения ИБС типична аутоенсибилизация к модифицированным ЛПНП в стенке артерий и содержимому атеросклеротических бляшек. В последующей цепи иммунных реакций, по-видимому, именно ИЛ-2 играет основную роль в пролиферации и дифференцировке Т-, В-лимфоцитов и цитотоксических клеток. В наших наблюдениях (табл.3) установлена отрицательная средней степени связь

между уровнем ИЛ-2 и липопротеинами высокой плотности (ЛПВП), $r=-0,64$, $p<0,05$, уровнем антител к кардиолипину и ЛПВП ($r=-0,76$, $p<0,05$), уровнем TNF- α и ЛПВП ($r=-0,70$, $p<0,05$). В тоже время установленные корреляционные связи не противоречат представлению о том, что у больных ИБС с абдоминальным ожирением и атерогенным фенотипом липопротеинов особенно высокие уровни активизации цитотоксических лимфоцитов и Fas-системы [3]. В наших наблюдениях также выявлена средней степени связь между индексом массы тела (ИМТ) и уровнем содержания TNF- α ($r_s=0,69$, $p<0,05$). Но достоверных различий в уровнях всех других изучаемых показателей у больных ИБС в сочетании с метаболическим синдромом и без него не выявлено.

Результаты изучения корреляционной связи между иммунными показателями и характером течения и факторами риска прогрессирования атеросклероза у больных ИБС, перенесших операцию КШ суммированы в табл.4.

Оказалось, что с возрастом отмечается тенденция к уменьшению содержания лимфоцитов, субпопуляций с фенотипами CD₃, HLADR, числа фагоцитирующих клеток и тенденция к повышению выработки аутоантител к кардиолипину и секреции TNF- α . В тоже время не установлено зависимости между возрастом, уровнем содержания в крови ИЛ-2 и лимфоцитов, несущих рецептор к ИЛ-2.

С увеличением количества лет после операции снижается уровень аутоантител к кардиолипину. Более тяжелое течение ИБС до операции реваскуляризации по таким признакам, как количество наложенных шунтов и развитие острого инфаркта миокарда до операции сопровождается уменьшением субпопуляции лимфоцитов CD₉₅, меченных к Fas-апоптозу, увеличением субпопуляции лимфоцитов с рецепторами к ИЛ-2 и уровня содержания ЦИК с IgM.

Представляется, что совокупность фактов, полученных при анализе корреляционной зависимости, не противоречит сформулированной концепции о своеобразии иммунного ответа, сопровождающего хроническое течение ИБС у больных после эффективной операции КШ [3]. Однако количество наблюдений не позволило четко ответить на вопрос о влиянии базисных средств лечения стабильной стенокардии и предупреждения прогрессирования атеросклероза. Всем больным после операции КШ назначались ингибиторы АПФ, бета-блокаторы, аспирин, нитраты и некоторым из них курсовое лечение статинами, на фоне которых отмечалась тенденция к снижению ряда показателей.

Полученные результаты обосновывают возможность заключения о том, что маркерами иммунного ответа организма на хроническое «неосложненное» течение ИБС после эффективных операций реваскуляризации миокарда можно считать концентрацию в крови больных цитокинов ИЛ-2 и TNF- α и индексы отношений маркеров

активизации Т-лимфоцитов и маркера апоптоза. Действительно (табл.5), выявлена прямая высокая корреляционная связь между уровнем содержания этих провоспалительных цитокинов ($r=0,99$, $p<0,001$), а также между уровнем цитокинов и аутоантител к кардиолипину: TNF- α и антител к кардиолипину ($r=0,74$, $p<0,05$), ИЛ-2 и аутоантител ($r=0,66$, $p<0,05$).

Список литературы

1. Визир В.А. Иммуновоспалительная активация как концептуальная модель формирования и прогрессирования сердечной недостаточности / В.А. Визир, А.Е. Березин // Терапевтический архив. – 2000. - №4. – С. 77-80.
2. Грацианский Н.А. Статины как противовоспалительные средства / Н.А. Грацианский // Кардиология. – 2001. - №12. – С. 14-26.
3. Добродеева Л.К. Иммунологическая реактивность и сердце / Л.К. Добродеева, О.А. Миролюбова, И.И. Чернов, А.Н. Шонбин. Сыктывкар, 2002. – 264 с.
4. Добродеева Л.К. Состояние иммунной системы человека на Севере / Л.К. Добродеева, Л.В. Сенькова // Сб. тр. Всеросс. конф. «проблемы экологии человека». – Архангельск, 2000. – С. 69-76.
5. Мазуров В.И. Изменение продукции некоторых провоспалительных цитокинов у больных различными вариантами ИБС / В.И. Мазуров, С.В. Столов, Н.Э. Линецкая // Медицинская иммунология. - 1999. - №5. – С. 53-59.
6. Нагорнев В.А. Роль инфекции в развитии иммунного воспаления и патогенезе атеросклероза / В.А. Нагорнев, С.В. Мальцева // Архив патологии. – 2000. - №6. – С. 55-59.
7. Палеев Н.Р. Цитокины и их роль в патогенезе заболеваний сердца / Н.Р. Палеев, Ф.Н. Палеев // Клиническая медицина. – 2004. - №5. – С. 4-7.
8. Matsumori A., Yamada T., Suzuki H. et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. Heart J 1994; 72: 561-566.

The characteristic of the immune answer at patients with coronary heart disease in the remote terms after operation of coronary shunting
Hlopina I.A., Shatsova E.N., Dobrodeyeva L.K.

Northern state medical university, Arkhangelsk

In the article the findings of investigation of a immune answer on a level of lymphocyte subpopulations, CIC, phagocytic indexes and cytokines are submitted. The comparative analysis of a level of an immune answer in group of the men who have transferred operation of coronary shunting and in control group without clinical attributes of coronary heart disease is conducted. Activation of cellular and humoral parts of immunity and phagocytosis are detected. Reduction in concentration TNF- α , increase of levels IL-2, indexes CD₂₅/CD₉₅ and HLADR/CD₉₅ can be markers of the immune answer on chronic "not complicated" current of coronary heart disease after effective revascularisation of a myocardium.

Key words: coronary shunting, revascularisation, immune inflammation, cytokines, phagocytic indexes.

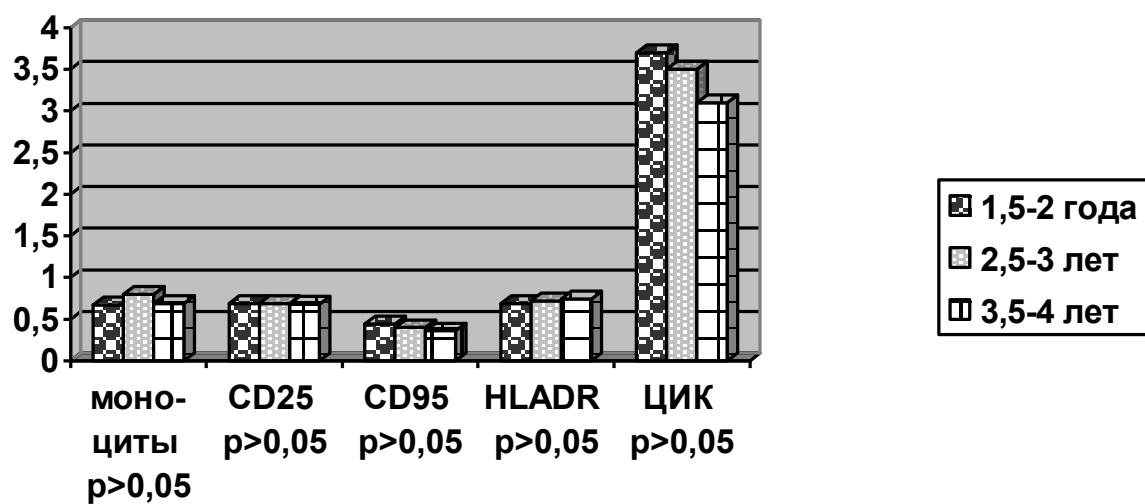


Рис.1. Иммунологические показатели у больных в зависимости от числа лет после операции.

Таблица 1

Иммунологические показатели в исследуемых группах (M±S.D.)

Показатели	Больные ИБС, перенесшие операцию n=20	Группа сравнения n=80
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,69±1,89	6,08±1,08*
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,28±0,65	2,17±0,51
Лимфоциты, %	30,60±8,70	35,30±3,49*
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	4,46±1,63	3,65±0,98*
Нейтрофилы, %	56,95±11,43	56,35±9,08
Моноциты, 10 ⁹ /л	0,72±0,25	0,30±0,13*
Моноциты, %	9,55±3,21	4,75±1,97*
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,18±0,26	0,14±0,08
Эозинофилы, %	2,26±1,70	2,34±1,06
Фагоцитарное число	15,91±7,34	8,55±4,48*
Активные фагоциты, %	44,00±8,02	49,44±7,43*
CD ₃ , 10 ⁹ /л	1,05±0,21	0,85±0,31*
CD ₄ , 10 ⁹ /л	0,51±0,10	0,42±0,21
CD ₅ , 10 ⁹ /л	0,46±0,13	0,90±0,22*
CD ₈ , 10 ⁹ /л	0,30±0,05	0,33±0,17
CD ₁₆ , 10 ⁹ /л	0,30±0,10	0,38±0,12
CD ₂₅ , 10 ⁹ /л	0,69±0,09	0,49±0,28*
CD ₇₁ , 10 ⁹ /л	0,24±0,08	0,52±0,26*
CD ₉₅ , 10 ⁹ /л	0,40±0,08	0,44±0,04
HLADR, 10 ⁹ /л	0,72±0,11	0,51±0,17*
ЦИК средние с IgA, г/л	4,15±1,42	2,26±0,91*
ЦИК крупные с IgM, г/л	3,81±1,03	2,11±0,87*

Примечание. * - достоверность различий значений показателей у больных ИБС и группы сравнения (p<0,05).

Таблица 2

Иммунологические показатели в исследуемых группах (M±S.D., медиана и квантили)

Показатели	Больные ИБС, перенесшие операцию	Группа сравнения n=20
TNF- α , пг/л	14,75 (5,26-8,92), n=15	14,15±3,68
ИЛ-2, пг/л	3,01 (2,05-8,51), n=20	0,67±0,08*
Антитела к кардиолипину, ЕД/мл	7,10±2,45, n=15	6,9±2,8

Примечание. * - достоверность различий значений показателей у больных ИБС и группы сравнения ($p < 0,05$).

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между иммунологическими и метаболическими показателями (r , r_s)

Иммунологический показатель	Метаболический показатель	r , r_s	p
ИЛ-2	ЛПВП	$r=-0,64$	$p < 0,05$
Антитела к кардиолипину	ЛПВП	$r=-0,76$	$p < 0,05$
TNF- α	ЛПВП	$r=-0,70$	$p < 0,05$
	ИМТ	$r_s=0,69$	$p < 0,05$

Таблица 4

Коэффициенты корреляции между иммунологическими и другими изучаемыми показателями (r_s)

Иммунологический показатель	Сопоставимый показатель	r_s	p
Лимфоциты	Возраст	-0,50	< 0,05
CD ₃	Возраст	-0,52	< 0,05
CD ₂₅	Число перенесенных ОИМ до операции	0,45	< 0,05
CD ₉₅	Число шунтов	-0,57	< 0,01
HLADR	Возраст	-0,58	< 0,01
% активных фагоцитов	Возраст	-0,45	< 0,05
TNF- α	Возраст	0,68	< 0,05
Антитела к кардиолипину	Возраст	0,67	< 0,05
	Число лет после операции	-0,72	< 0,05
ИЛ-2	Число лет после операции	-0,49	< 0,05
ЦИК с IgM	Число шунтов	0,53	< 0,05

Таблица 5

Коэффициенты корреляции между цитокинами ИЛ-2, ФНО- α , антителами к кардиолипину

Показатели	r	p
ИЛ-2 и TNF- α	0,99	< 0,001
TNF- α и антитела к кардиолипину	0,74	< 0,05
ИЛ-2 и антитела к кардиолипину	0,66	< 0,05