

[https://doi.org/10.30702/ujcvs/23.31\(03\)/GL008-2230](https://doi.org/10.30702/ujcvs/23.31(03)/GL008-2230)
УДК 616.127-005.4+612.017+616.153.963.915

Гавриленко Т. І.¹, д-р біол. наук, професор, зав. відділу імунології та біохімії, <https://orcid.org/0000-0002-1905-8240>

Ломаковський О. М.¹, канд. мед. наук, ст. наук. співробітник відділу атеросклерозу та хронічної ішемічної хвороби серця, <https://orcid.org/0000-0002-2490-2733>

Підгайна О. А.¹, канд. мед. наук, ст. наук. співробітник відділу імунології та біохімії, <https://orcid.org/0000-0003-2388-3275>

Распутняк О. В.², канд. мед. наук, лікар-кардіолог відділення хірургічного лікування складних порушень ритму серця з рентгеноопераційною, <https://orcid.org/0000-0002-8716-6753>

Рижкова Н. О.¹, канд. мед. наук, ст. наук. співробітник відділу імунології та біохімії, <https://orcid.org/0000-0002-5341-0594>

Гречківська Н. В.³, д-р мед. наук, професор кафедри терапії, інфекційних хвороб та дерматовенерології післядипломної освіти, <https://orcid.org/0000-0001-6497-2149>

¹ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска НАМН України», м. Київ, Україна

²ДУ «Національний інститут серцево-судинної хірургії імені М. М. Амосова НАМН України», м. Київ, Україна

³Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна

Імунологічна реактивність та інтенсивність оксидативного стресу при стабільній ішемічній хворобі серця

Резюме

Мета – проаналізувати зв'язок між факторами імунної відповіді та інтенсивністю окиснення ліпопротеїнів і білків у пацієнтів зі стабільною ішемічною хворобою серця (ІХС) для уточнення патогенезу коронарного атеросклерозу.

Матеріали та методи. Обстежено 179 хворих зі стабільною ІХС, II–IV функціонального класу, середній вік яких становив 56 (49–62) років (основна група), та 30 практично здорових осіб, середній вік яких сягав 49 (45–53) років (контрольна група). Матеріалом для імунологічного дослідження була периферична венозна кров. Для визначення показників імунітету використовували метод проточної лазерної цитометрії та імуноферментний аналіз. Спектрофотометричним та флюорометричним методами визначали в сироватці крові та в атерогенних ліпопротеїнах рівні проміжних і кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків, а також ферментів антиоксидантного захисту.

Результати. Виявлено прямий зв'язок між активністю перекисного окиснення ліпопротеїнів та окиснення білків з імунною реакцією за клітинним типом та імунним запаленням.

Висновки. Висока інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та окиснення білків у пацієнтів зі стабільною ІХС (стабільна стенокардія напруження) поєднуються зі значною активацією Т-клітинної ланки імунної відповіді (за співвідношенням хелперних та цитотоксичних субпопуляцій Т-лімфоцитів, за високими концентраціями прозапальних цитокінів, станом системи CD40/CD40L, рівнем експресії на клітинах маркера апоптозу CD95), що свідчить про взаємозалежність Т-клітинної ланки імунітету та оксидативного стресу в патогенезі атеросклерозу.

Залежність гіперпродукції мононуклеарними клітинами крові прозапальних цитокінів від вільнорадикального окиснення білків, перекисного окиснення апоВ білків та інтенсивності антиперекисного захисту (ферменти каталаза і супероксиддисмутаза) у пацієнтів зі стабільною ІХС свідчить про сприяння оксидативного стресу розвитку імунного запалення.

Комплексне вивчення факторів імунологічної реактивності, порушення якої може призвести до розвитку імунопатологічних реакцій, та інтенсивності окиснення ліпопротеїнів і білків у пацієнтів зі стабільною

ІХС сприяє уточненню патогенетичного зв'язку між хронічним імунним запаленням, ендотеліальною дисфункцією та оксидативним стресом, а також обґрунтовує доцільність загальних терапевтичних підходів до лікування ІХС.

Ключові слова: коронарний атеросклероз, імунопатологічні реакції, імунне запалення, система CD40/CD40L, антиперекисний захист.

Вступ. Атеросклеротичні серцево-судинні захворювання є основною причиною інвалідності та смерті в усьому світі. Ішемічна хвороба серця (ІХС) та ішемічний інсульт являють собою основні клінічні прояви атеросклерозу – хронічного запального процесу, що уражує великі та середні артерії [1, 2]. Більшість терапевтичних підходів спрямовані на традиційні фактори ризику, але ігнорують фундаментальну роль імунної системи. Останні дані показують, що зменшення запалення може обмежити серцево-судинні події [2]. Як відомо за даними літератури, атеросклероз не проявляється як класичне аутоімунне захворювання з раннім порушенням толерантності до власних антигенів, а натомість включає аутоімунні відповіді на змінені або модифіковані власні антигени чи індуковані стресом неоаутоантигени [2, 3]. Ідентифіковано декілька антигенів, що походять з окиснених ліпопротеїнів, судинної стінки та класичних аутоантигенів [4]. Частина ліпопротеїнів може бути модифікована в інтимі за допомогою окиснювачів і ферментів, протеаз і ліпаз, що виділяються місцевими клітинами [5, 6]. Атеросклеротичні ураження містять ліпопротеїни, які демонструють ознаки значного окиснення, протеолізу та ліполізу різних молекул ліпідів і які часто агреговані [7]. Вважається, що схильність до агрегації частинок ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) пов'язана з майбутніми серцево-судинними подіями [8, 9].

Ступінь окиснення ЛПНЩ у людей є різним. Дві основні модифікації, отримані *in vitro*, – окиснені міддю ЛПНЩ і модифіковані малоновим діальдегідом (МДА-ЛПНЩ) – розпізнаються людськими аутоантитілами. Обидві форми мають МДА-лізин, як основний епітоп, специфічний для окиснення, але МДА-ЛПНЩ містить приблизно в 10 разів більшу кількість епітопа [10]. Apo-AI, основний білок ліпопротеїнів високої щільності, та ApoB білок також можуть бути модифіковані або окиснені, що робить їх імуногенними і дисфункціональними [11]. Електронегативні, карбамільовані та глікозильовані ЛПНЩ містяться вже в кровообігу і можуть ініціювати утворення пінистих клітин у клітинній культурі [12]. Це свідчить про те, що модифікаційні зміни ініційовані вже в плазмі крові [13]. Переважна більшість циркулюючих окиснених ЛПНЩ пов'язана з антитілами та виявляється у вигляді імунних комплексів, які можуть стимулювати дендритні клітини та макрофаги й активацію запалення [14]. Крім того, фактором, що ініціює запалення при атеросклерозі, у багатьох дослідженнях вважають

надлишкове накопичення модифікованих ліпопротеїнів у стінках артерій, які здатні набувати властивостей аутоантигенів та вміст антитіл до них часто корелює з важкістю перебігу ІХС.

Окиснення ЛПНЩ в інтимі та пов'язане з ним запалення судин [15] викликає адаптивні імунні відповіді, які суттєво модулюють атеросклероз, починаючи від ініціації та прогресування ураження до появи клінічних подій [16, 17]. Накопичення доказів також вказує на те, що адаптивний імунітет у відповідь на ішемічне ураження серця [18] є модулятором як постішемічного ремоделювання серця, так і прогресування атеросклерозу [19, 20, 21]. Адаптивний імунітет, як його гуморальна складова (продукція специфічних антитіл плазматичними клітинами, в які трансформуються В-лімфоцити внаслідок антигенної стимуляції), так і Т-клітинний компонент, який або активує В-клітини, або диференціюється в ефекторні Т-клітини, що дозрівають шляхом презентації антигенів антигенпрезентуючими клітинами, значною мірою бере участь в атерогенезі [22]. Т-хелпери (CD3+4+), Т-цитотоксичні (CD3+8+) лімфоцити рекрутуються в атеросклеротичні ураження та демонструють ознаки активації [20, 21, 22, 23, 24].

Електронегативні ЛПНЩ стимулюють утворення факторів транскрипції ядерного фактора каппа, хемоаттрактантів ІЛ-8 і моноцитарного хемотаксичного білка 1 (MCP 1), цитокінів інтерлейкінів 6 (ІЛ-6) та ІЛ-1β, TNF-α, ІЛ-10 [25, 26], тромбоцитарного фактора росту, гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора і фактора росту ендотелію судин [27]. Аутоімунітет проти антигенів включає CD4+ Т-хелпери, які інструктують мієлоїдні клітини, і антиген-специфічні антитіла, які можуть безпосередньо змінювати патогенність цих антигенів [28]. Повідомлялося про відмінну роль різних підмножин В-клітин. Антитіла IgM до окиснених ЛПНЩ, що виробляються клітинами В1, є атеропротекторними; антитіла IgG проти окиснених ЛПНЩ, що виробляються підгрупами В2-клітин, є проатерогенними [20, 28]. Деякі дослідження виявили асоціацію високих вихідних рівнів IgG до МДА-ЛПНЩ з розвитком коронарних подій [29]. Навпаки, виявлено, що рівні IgG проти нативних і модифікованих МДА p45 і p210 були обернено пов'язані з атеросклерозом і майбутніми подіями [30]. Адаптивна імунна відповідь при атеросклерозі може бути про- або протизапальною і, таким чином, про- або антиатерогенною. Маніпулювання адаптивною

імуною системою за допомогою імуномодулюючих стратегій або вакцинації є привабливою концепцією. Обмеження прогностичної здатності тваринних моделей і відсутність повного розуміння ролі аутоантител, В- і Т-клітин створюють серйозні перешкоди для розуміння атерогенезу [28].

Мета – проаналізувати зв'язок між факторами імуноної відповіді та інтенсивністю окиснення ліпопротеїнів і білків у пацієнтів зі стабільною ІХС для уточнення патогенезу коронарного атеросклерозу.

Матеріали та методи. Це дослідження засновано на аналізі результатів обстеження 179 хворих на ІХС (стабільна стенокардія напруження у хворих II–IV функціонального класу). Середній вік загальної групи пацієнтів становив 56 (49–62) років. Діагноз стабільної стенокардії встановлювали за даними незмінних клінічних проявів стенокардії напруження впродовж останніх 2 місяців, позитивного навантажувального тесту та обструктивного ураження артерій серця за результатами коронарографії. Функціональний клас хворих на ІХС зі стабільною стенокардією напруження визначали за класифікацією Канадського кардіоваскулярного товариства та за допомогою подвійного добутку значень частоти серцевих скорочень та систолічного артеріального тиску, що були досягнуті на граничній висоті навантажування за позитивної проби. Контрольну групу становили 30 практично здорових осіб, середній вік яких сягав 49 (45–53) років, з інтактними коронарними артеріями за даними коронарографії, відсутністю синдрому стенокардії та негативним результатом навантажувальних проб. Критеріями невключення пацієнтів у дослідження були: наявність запальних процесів, інфекційних, онкологічних та ревматичних захворювань, хронічної серцевої недостатності ІІБ–ІІІ стадії, ниркової або печінкової недостатності, алергічних захворювань, хвороб крові, недавніх травм, операцій та інвазивних втручань.

Імунологічні показники та активність перекисного окиснення ліпопротеїнів і білків досліджувалися в периферичній крові, взятій натще. Лабораторні показники були досліджені в порівнянні з відповідними у практично здорових осіб. Рівні фактора некрозу пухлин α (ФНП α), ІЛ-6, ІЛ-4, ІЛ-8, ІЛ-2, ІЛ-10 та інтерферону γ (ІФН- γ) визначали в сироватці крові та супернатанті мононуклеарних клітин (моноцити та лімфоцити) (с/н МН) за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу на автоматичному імуноферментному фотоелектричному аналізаторі iEMS (виробник LabSystems, Фінляндія) з використанням ELISA-наборів фірм Amersham (США), Biosource (Канада) та Diaclone (Франція). З використанням методу імуноферментного аналізу, із застосуванням відповідних тест-систем також проводили кількісне визначення в сироватці крові високочутливого С-реактивного білка

(СРБ) (DAI, США та Diagnostic Automation, Канада), розчинного CD40 ligand (sCD40L) (тест-системи Bender MedSys, Австрія) та рівнів антитіл до окиснених ліпопротеїнів низької щільності (тест-системи Biomedica Gruppe). Визначення в сироватці крові вмісту циркулюючих імуних комплексів та концентрації холестерину в складі імуних комплексів проводили спектрофотометричним методом на фотометрі BioSystems BTS-330, Іспанія. Для кількісного визначення вмісту антитіл до антигенів тканин міокарда та судинної стінки (водно-сольові екстракти) використовували реакцію поглинання комплементу. Неспецифічну проліферативну активність лімфоцитів оцінювали в реакції бласттрансформації (РБТЛ) з фітогемаглютиніном (ФГА); специфічну сенсibilізацію лімфоцитів до антигенів тканин судинної стінки також визначали в реакції бласттрансформації [31].

Імунофенотипування лімфоцитів проводили за допомогою проточної лазерної цитометрії (цитометр FACScan Becton Dickinson та моноклональні антитіла фірми Caltag laboratories, США). Визначали вміст у периферичній крові популяції лімфоцитів (Лф): CD3+19– (Т-клітини), CD3+4+8– (Т-хелпери/індуктори), CD3+4–8+ (Т-супресори / цитотоксичні клітини), CD3–16+ (природні кілери, НК-клітини), CD3–19+ (В-лімфоцити) [32]. Також досліджували експресію поверхневих антигенів: CD95+ (рецептор Fas (APO1), для якого була доведена роль у розвитку апоптозу); CD11+ (ліганд ICAM-1 лімфоцитів); CD40+ (рецептор стимуляції В-лімфоцитів); CD120+ (рецептори ФНП α на лімфоцитах); CD154+ (ліганд CD40 на Т-лімфоцитах).

Рівні проміжних та кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів (ДК) і маленового діальдегіду (МДА) визначали в сироватці крові спектрофотометричним методом. Ступінь перекисної модифікації ліпопротеїнів (СПМЛП) низької та дуже низької щільності визначали прямим шляхом. Вміст кінцевих продуктів окиснювальної модифікації білків, зокрема перекисного окиснення аполіпопротеїну В (ПО апоВ), у сироватці крові визначали спектрофотометричним методом. Активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази (ферменти антиоксидантного захисту) визначали за допомогою флюорометричного та спектрофотометричного методів [33].

Обробку результатів виконували на персональному комп'ютері з використанням пакета статистичного аналізу Statistica 7. Для вибору способу опису кількісних показників оцінювали вид розподілу даних (належність вибірки до нормального закону розподілення) з використанням універсального критерію перевірки гіпотези – критерію Шапіро – Уїлка (W). Порівняння груп за досліджуваними показниками проводили з використанням непараметричних методів статистики. Дані представлені медіаною (Me) та інтерквартильним інтервалом (значення 25-го та

75-го процентилей). Різницю між групами оцінювали за рівнем значущості p . Для порівняння двох незалежних груп за кількісною ознакою використовували U -критерій Манна – Уїтні для перевірки гіпотези щодо рівності середніх рангів. Під час оцінювання якісних ознак у групах порівняння зіставляли відносні частоти (відсотки). Для аналізу зв'язку двох ознак використовували коефіцієнт кореляції Спірмена (R Spearman) та точне значення p .

Результати та їх обговорення. Відомо, що розвиток атеросклерозу корелює як з рівнем функціональної активності імунної системи, так і з високим ступенем перекисного окиснення ліпопротеїнів. З огляду на це було оцінено зв'язок перекисного окиснення ліпідів та окиснення білків зі станом імунологічної реактивності у пацієнтів зі стабільною ІХС.

Як свідчать наведені в таблиці 1 дані щодо зв'язку між станом перекисного окиснення ліпопротеїнів та показниками Т-клітинної імунної відповіді, у пацієнтів з ІХС виявлено слабку зворотну достовірну кореляцію між інтенсивністю вільнорадикального окиснення білка (ВРОБ) та загальним вмістом Т-лімфоцитів у крові ($R = -0,16$; $p = 0,034$).

У пацієнтів з нормальною та підвищеною інтенсивністю вільнорадикальних окиснювальних реакцій рівень Т-лімфоцитів крові становив відповідно 70 (64–74) проти 67 (62–71) % ($p = 0,008$) при референтному значенні 64 (60–60) %. Поряд з цим, визначена слабка зворотна достовірна кореляція між рівнем ВРОБ та кількістю Т-хелперів у периферичній крові ($R = -0,16$; $p = 0,029$; $n = 178$). У хворих з непорушеним та високим рівнями вільнорадикального окиснення білка від-

носний рівень субпопуляції Т-хелперних лімфоцитів становив відповідно 41 (35–46) проти 38 (33–44) % ($p = 0,015$). У пацієнтів з непорушеним та підвищеним ступенем СПМЛП рівень Т-цитотоксичних лімфоцитів крові становив відповідно 29 (24–33) проти 25 (22–29) % ($p = 0,0001$). Виявлена помірна зворотна кореляція між кількістю Т-цитотоксичних лімфоцитів крові та СПМЛП ($R = -0,28$; $p = 0,0001$; $n = 162$). Відзначена слабка зворотна кореляція між рівнем Т-цитотоксичних лімфоцитів та каталазою ($R = -0,20$; $p = 0,008$), хоча рівень Т-цитотоксичних лімфоцитів крові у хворих з низьким та нормальним рівнем каталази досягав 26 (23–31) проти 26 (23–31) % ($p = 0,96$). Імунорегуляторний індекс (Тх/Тц) у пацієнтів з нормальним та високим ступенем перекисної модифікації ліпопротеїнів дорівнював відповідно 1,3 (1,0–1,7) проти 1,5 (1,2–2,0) ум. од. ($p = 0,009$), а в пацієнтів зі зниженим та непорушеним рівнем активності каталази – 1,5 (1,2–1,5) проти 1,4 (1,1–1,9) ум. од. ($p = 0,62$) при нормі 1,5 (1,3–1,8) ум. од. Виявлено слабкий прямий зв'язок між індексом Тх/Тц і СПМЛП ($R = 0,23$; $p = 0,003$) та каталазою ($R = 0,18$; $p = 0,015$). У хворих з підвищеним та непорушеним рівнями малонового діальдегіду крові рівень проліферативної неспецифічної активності лімфоцитів на міоген фітогемоглютенін (РБТЛ з ФГА) становив 43 (37–49) проти 47 (40–51) % ($p = 0,049$). Кореляція між вмістом МДА та проліферативною активністю лімфоцитів (за РБТЛ) дорівнювала $-0,20$ ($p = 0,024$). При підвищеному та непорушеному рівнях СПМЛП крові рівень РБТЛ був відповідно 43 (37–48) проти 45 (40–51) % ($p = 0,029$). Була визначена слабка зворотна достовірна кореля-

Таблиця 1

Кореляційний зв'язок перекисного окиснення ліпопротеїнів та білків з показниками клітинного імунітету у хворих на ІХС зі стабільною стенокардією (коефіцієнт кореляції Спірмена)

Показники	Інтенсивність вільнорадикальних окиснювальних реакцій					Стан системи антиоксидантного захисту	
	ДК	МДА	СПМЛП	ВРОБ	ПО аполіпропротеїну В	Каталаза	СОД
Т-лімфоцити (CD3+19-)	-0,03	-0,03	-0,14	-0,16*	0,07	0,04	0,16
Т-хелпери (CD3+4+8-)	-0,01	-0,04	0,09	-0,16*	0,02	0,10	0,02
Т-супресори / цитотоксичні клітини (CD3+4-8+)	0,04	-0,06	-0,28*	0,11	-0,07	-0,20	0,15
Індекс Тх/Тц	-0,01	0,01	0,23*	-0,14	0,05	0,18*	-0,16
В-лімфоцити	0,10	-0,13	0,18	-0,01	-0,10	-0,01	0,02
РБТЛ з ФГА	0,07	-0,20*	-0,20*	-0,12	-0,20*	-0,04	0,04
НК-клітини (CD3-16+)	0,03	-0,11	0,05	0,05	-0,03	-0,10	-0,04
CD95	-0,19*	-0,05	0,03	-0,09	0,04	-0,14	0,32*

Примітка. * – $p < 0,05$. Тх – Т-хелпери, Тц – Т-супресори / цитотоксичні клітини.

ція між РБТЛ та СПМЛП ($R = -0,20$; $p = 0,01$), між реакцією бластної трансформації лімфоцитів і перекисним окисненням апоВ білків ($R = -0,20$; $p = 0,011$; $n = 154$). Спонтанний рівень γ -інтерферону в супернатанті мононуклеарів сягав при високому та нормальному рівні СПМЛП 7 (3–13) проти 48 (5–1630) пг/мл ($p = 0,0001$) ($R = -0,29$; $p = 0,0009$), при зниженому та непорушеному рівнях каталази – 12 (5–105) проти 11 (3–95) пг/мл ($p = 0,47$) ($R = -0,29$; $p = 0,0004$), при зниженому та непорушеному рівнях СОД – 21 (3–484) проти 14 (5–164) пг/мл ($p = 0,76$) ($R = 0,28$; $p = 0,002$). Рівень інтерферону- γ у сироватці крові у пацієнтів при зниженому та непорушеному рівнях каталази крові був 10 (8–11) проти 12 (11–12) пг/мл ($p = 0,039$) ($R = 0,66$; $p = 0,004$). У пацієнтів з ІХС рівень готовності до апоптозу лімфоцитів (за рівнем експресії CD95+ на поверхні) дорівнював при підвищених та непорушених значеннях дієнових кон'югатів крові 10 (8–16) проти 13 (9–25) % ($p = 0,18$) ($R = -0,19$; $p = 0,031$). Відповідно, при знижених та непорушених значеннях супероксиддисмутази рівень готовності до апоптозу становив 10 (8–15) проти 12 (8–26) % ($p = 0,18$) ($R = 0,32$; $p = 0,0003$). Фактор стимуляції Т-клітинної імунної відповіді ІЛ-2 (за рівнями у сироватці крові) при високому та нормальному ступені перекисної модифікації ліпопротеїнів визначався у концентраціях 16,0 (13,0–42,0) проти 3,4 (1,0–12,3) пг/мл ($p = 0,0001$) ($R = 0,30$; $p = 0,027$). При зниженому рівні каталази відповідно 5,6 (2,2–13,6) проти 12,0 (3,0–24,0) пг/мл ($p = 0,22$) ($R = 0,50$; $p = 0,0001$). При підвищеному та незміненому рівнях перекисного окиснення апоВ білка – 12,0 (3,0–20,0) проти 4,0 (2,0–15,0) пг/мл ($p = 0,28$) ($R = 0,27$; $p = 0,038$).

Отже, на основі визначених достовірного зворотного зв'язку рівня дієнових кон'югатів крові з готовністю до апоптозу лімфоцитів (за експресією CD95+), прямого достовірного зв'язку ступеня перекисної модифікації ліпопротеїнів з активністю Т-лімфоцитів за експресією CD154+ на своїй поверхні та концентрацією ІЛ-2 у сироватці крові, перекисного окиснення апоВ білків з активністю Т-лімфоцитів за sCD40L, рівня СОД крові з активністю Т-лімфоцитів за CD154+ можна зробити висновок про підвищену активність Т-клітинної імунної відповіді за наявності оксидативного стресу.

Зіставлення показників перекисного окиснення ліпопротеїнів та білків з факторами імунного запалення у хворих з ІХС зі стабільною стенокардією (таблиця 2) показало слабку пряму достовірну кореляцію прозапального ФНПа в супернатанті мононуклеарів крові з рівнем первинного продукту перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів ($R = 0,17$; $p = 0,043$; $n = 134$).

Так, у пацієнтів з високим та нормальним рівнем ДК крові вміст у супернатанті мононуклеарів ФНПа дорівнював відповідно 261 (98–825) проти 153 (63–338) пг/мл ($p = 0,013$). При високому та нормальному рівні перекисного окиснення апоВ білків вміст у супернатанті мононуклеарів крові прозапального ІЛ-6 сягав 2650 (1640–4264) проти 2085 (1320–3005) пг/мл ($p = 0,039$) ($R = 0,20$; $p = 0,018$). У хворих з високим та нормальним рівнем перекисного окиснення апоВ білків вміст у супернатанті мононуклеарів крові прозапального ІЛ-8 становив відповідно 2005 (1177–3240) проти 1423 (1040–2010) пг/мл ($p = 0,059$) ($R = 0,20$; $p = 0,018$). Крім того, виявлений прямий достовірний кореляційний зв'язок між вмістом ІЛ-8 у супернатанті мононуклеарних клітин та рівнями СОД ($R =$

Таблиця 2

Зв'язок перекисного окиснення ліпопротеїнів та білків з факторами імунного запалення та цитокіновим статусом у пацієнтів з ІХС зі стабільною стенокардією (коефіцієнт кореляції Спірмена)

Показники	Інтенсивність вільнорадикальних окиснювальних реакцій					Стан системи антиоксидантного захисту	
	ДК	МДА	СПМЛП	ВРОБ	ПО аполіпопротеїну В	Каталаза	СОД
СРБ	0,06	0,04	0,07	-0,05	0,06	0,10	0,09
ФНПа в с/н МН	0,17*	-0,07	-0,03	-0,001	0,06	0,10	-0,04
ІЛ-2 сироватки	-0,07	-0,18	0,30*	-0,48*	0,27*	0,50*	0,01
ІЛ-2 в с/н МН	-0,06	-0,17	0,08	0,36*	-0,28	0,02	0,13
ІЛ-4 сироватки	-0,56	-0,47	-0,40*	-0,40*	0,08	0,13	-0,10
ІЛ-6 в с/н МН	0,06	-0,11	0,09	0,01	0,20*	0,16	0,08
ІЛ-8 в с/н МН	-0,27*	-0,07	0,03	-0,30*	0,20*	0,06	0,39*
ІЛ-10 в с/н МН	-0,05	0,01	0,29*	-0,08	0,29*	0,02	0,30*
ІЛ-10 сироватки	-0,24	0,18	0,09	-0,73*	-0,10	0,53*	-0,64*
ІФН γ сироватки	-	-	-0,19	-0,07	0,11	0,66*	-
ІФН γ в с/н МН	0,14	0,02	-0,29*	0,12	-0,01	-0,29*	0,28*

Примітка. * – $p < 0,05$.

0,39; $p = 0,0001$). Таким чином, секреція прозапальних цитокінів мононуклеарами крові пов'язана з рівнями дієнових кон'югатів, вільнорадикального окиснення білків, перекисного окиснення апоВ білків та активністю ферментів антиперекисного захисту каталази та СОД, що свідчить про взаємодію цих ланок патогенезу атеросклерозу.

За результатами наших попередніх досліджень щодо зв'язку дисліпідемії та оксидативного стресу зі станом гуморального імунітету у пацієнтів з ІХС зі стабільною стенокардією та проведеного багатофакторного регресійного аналізу не було виявлено сумарного впливу дисліпідемії та перекисного окиснення на досліджувані показники гуморального імунітету [34].

Нові докази стимулювали значну еволюцію концепцій, що стосуються атеросклерозу, і поставили під сумнів багато попередніх понять. Профіль факторів ризику змістився в міру зниження рівня холестерину ліпопротеїнів низької щільності, артеріального тиску і куріння. Недавні дослідження кинули виклик захисним ефектам ліпопротеїнів високої щільності, і тепер зосереджені на ліпопротеїнах, багатих тригліцеридами, на додаток до ліпопротеїнів низької щільності, які є ключовими при атеросклерозі [1].

Завдяки відкриттю та визначенню в науковому світі поняття про міжклітинну кооперацію клітин в ході розвитку гуморальної імунної відповіді було з'ясовано, що хелперна функція Т-лімфоцитів може бути реалізована шляхом виділення цитокінів та безпосередньо через прямі контактні взаємодії між Т- та В-лімфоцитами. У здійсненні такого типу клітинної кооперації головна роль належить взаємодії двох пар молекул: CD40 В-клітин та CD40L (CD154) Т-клітин.

Як показали наші дослідження, в обстежених пацієнтів вміст у крові CD40+ лімфоцитів статистично не відрізнявся від такого у практично здорових осіб. Проте кількість лімфоцитів, що експресували

на своїй поверхні мембранну форму CD40L (CD154+ лімфоцити) перевищувала норму з високим ступенем достовірності. Дані щодо кореляційного зв'язку показників системи CD40/CD40L зі станом перекисного окиснення ліпопротеїнів та білків наведено в таблиці 3.

Як свідчать наведені у таблиці 3 результати, маркер активації Т-лімфоцитів – розчинний CD40L – у пацієнтів з підвищеним та незмінним рівнем вільнорадикального окиснення білка становив 4,1 (2,2–7,9) проти 3,4 (1,9–5,0) нг/мл ($p = 0,10$) ($R = 0,24$; $p = 0,024$), а при підвищеному та зниженому рівні перекисного окиснення апоВ білка – 4,3 (2,1–7,0) проти 2,5 (1,7–4,8) нг/мл ($p = 0,043$) ($R = 0,25$; $p = 0,023$). Експресія костимуляційних молекул CD154+ на Т-хелперах у хворих з високим та нормальним рівнем перекисної модифікації ліпопротеїнів дорівнювала 54 (48–65) проти 32 (24–49) % ($p = 0,01$) ($R = 0,54$; $p = 0,0001$), у пацієнтів зі зниженим та непорушеним рівнями супероксиддисмутази – 31 (22–38) проти 46 (26–67) % ($p = 0,036$) ($R = 0,48$; $p = 0,0001$), у пацієнтів з підвищеним та непорушеним рівнями перекисного окиснення апоВ білка – 31 (22–38) проти 54 (38–70) нг/мл ($p = 0,0001$) ($R = -0,50$; $p = 0,0001$). Виявлена помірна пряма вірогідна кореляція між рівнем у крові CD40+ та рівнем ДК ($R = 0,25$; $p = 0,010$). Це свідчить про те, що активація Т-лімфоцитів та підвищення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та окиснення білків – це взаємопов'язані процеси в розвитку коронарного атеросклерозу.

Система CD40/CD40L відіграє важливу роль в ініціації ранніх атеросклеротичних змін, їх прогресуванні і розвитку гострих тромботичних ускладнень. Ліганд CD40 є трансмембранним глікопротеїдом сімейства чинників некрозу пухлин (CD154+). Він, як і його рецептор CD40, експресуються різними типами клітин, у тому числі і клітинами атеросклеротичної

Таблиця 3

Кореляційний зв'язок перекисного окиснення ліпопротеїнів та білків з показниками системи CD40/CD40L у хворих на ІХС зі стабільною стенокардією (коефіцієнт кореляції Спірмена)

Показники	Інтенсивність вільнорадикальних окиснювальних реакцій				Стан системи антиоксидантного захисту		
	ДК	МДА	СПМЛП	ВРОБ	ПО аполіпропротеїну В	Каталаза	СОД
Т-лімфоцити (CD3+19-)	-0,03	-0,03	-0,14	-0,16*	0,07	0,04	0,16
В-лімфоцити (CD3-19+)	0,10	-0,13	0,18	-0,01	-0,10	-0,01	0,02
CD40+ Лф (%)	0,25*	-0,13	0,16	0,12	-0,11	0,08	-0,17
CD154+ Лф (%)	-0,21	-0,08	0,54*	-0,54*	-0,01	0,20	0,48*
sCD40L (нг/мл)	0,07	-0,08	0,15	0,24*	0,25*	0,12	-0,14

Примітка. * – $p < 0,05$.

бляшки. Костимулююча молекула CD40 та її ліганд CD40L (CD154) відіграють центральну роль у регуляції запальної реакції під час розвитку атеросклерозу шляхом модуляції взаємодії між імункомпетентними клітинами, їх адгезії на активованому ендотелії судин та подальшою міграцією клітин у вогнище запалення [35].

Основне джерело циркулюючої в крові розчинної форми ліганду CD40 – активовані тромбоцити, при цьому сам маркер вважають одним з показників активації тромбоцитів. Оскільки розчинна форма ліганду CD40 є одночасно чинником запалення і тромбоутворення, вона розглядається багатьма дослідниками як маркер нестабільного перебігу ІХС [35].

Отримані нами дані також можуть свідчити про перспективність подальшого вивчення ролі системи CD40/CD40L при стабільній ішемічній хворобі серця, а також визначення рівня sCD40L як прогностичного маркера для оцінювання темпів прогресування хронічної ІХС в майбутньому та ризику виникнення ускладнень, таких як інфаркт міокарда та серцева недостатність.

Висновки

1. Висока інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та окиснення білків у пацієнтів зі стабільною ІХС (стабільна стенокардія напруження) поєднуються зі значною активацією Т-клітинної ланки імунної відповіді (за співвідношенням хелперних і цитотоксичних субпопуляцій Т-лімфоцитів, за високими концентраціями прозапальних цитокінів, станом системи CD40/CD40L, рівнем експресії на клітинах маркера апоптозу CD95), що свідчить про взаємозалежність Т-клітинної ланки імунітету та оксидативного стресу в патогенезі атеросклерозу.
2. Залежність гіперпродукції мононуклеарними клітинами крові прозапальних цитокінів від вільнорадикального окиснення білків, перекисного окиснення апоВ білків та інтенсивності антиперекисного захисту (ферменти каталаза і супероксиддисмутаза) у пацієнтів зі стабільною ІХС свідчить про сприяння оксидативного стресу розвитку імунного запалення.
3. Комплексне вивчення факторів імунологічної реактивності, порушення якої може призвести до розвитку імунопатологічних реакцій, та інтенсивності окиснення ліпопротеїнів і білків у пацієнтів зі стабільною ІХС сприяє уточненню патогенетичного зв'язку між хронічним імунним запаленням, ендотеліальною дисфункцією та оксидативним стресом, а також обґрунтовує доцільність загальних терапевтичних підходів до лікування ІХС.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Список використаних джерел

References

1. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524-533. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03392-8>
2. Mallat Z, Binder CJ. The why and how of adaptive immune responses in ischemic cardiovascular disease. *Nat Cardiovasc Res*. 2022;1:431-444. <https://doi.org/10.1038/s44161-022-00049-1>
3. Bjorkegren JLM, Kovacic JC, Dudley JT, Schadt EE. Genome-Wide Significant Loci: How Important Are They? Systems Genetics to Understand Heritability of Coronary Artery Disease and Other Common Complex Disorders. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(8):830-845. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.12.033>
4. Porsch F, Mallat Z, Binder CJ. Humoral immunity in atherosclerosis and myocardial infarction: from B cells to antibodies. *Cardiovasc Res*. 2021;117(13):2544-2562. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab285>
5. Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2020;41(24):2313-2330. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz962>
6. Maaninka K, Nguyen SD, Mäyränpää MI, Plihtari R, Rajamäki K, Lindsberg PJ, et al. Human mast cell neutral proteases generate modified LDL particles with increased proteoglycan binding. *Atherosclerosis*. 2018;275:390-399. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.016>
7. Öörni K, Kovanen PT. Aggregation Susceptibility of Low-Density Lipoproteins-A Novel Modifiable Biomarker of Cardiovascular Risk. *J Clin Med*. 2021 Apr 19;10(8):1769. <https://doi.org/10.3390/jcm10081769>
8. Heffron SP, Ruuth MK, Xia Y, Hernandez G, Äikäs L, Rodriguez C, et al. Low-density lipoprotein aggregation predicts adverse cardiovascular events in peripheral artery disease. *Atherosclerosis*. 2021;316:53-57. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.11.016>
9. Ruuth M, Nguyen SD, Vihervaara T, Hilvo M, Laajala TD, Kondadi PK, et al. Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *Eur Heart J*. 2018;39(27):2562-2573. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy319>
10. Virella G, Wilson K, Elkes J, Hammad SM, Rajab HA, Li Y, et al. Immune complexes containing malondialdehyde (MDA) LDL induce apoptosis in human macrophages. *Clin Immunol*. 2018;187:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.06.010>
11. Gonen A, Choi SH, Miu P, Agatista-Boyle C, Acks D, Taylor AM, et al. A monoclonal antibody to assess oxidized cholesteryl esters associated with apoA1 and apoB-100 lipoproteins in human plasma. *J Lipid Res*. 2019;60(2):436-445. <https://doi.org/10.1194/jlr.d090852>
12. Orekhov AN, Sobenin IA. Modified lipoproteins as biomarkers of atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23(8):1422-1444. <https://doi.org/10.2741/4653>

13. Tailleux A, Torpier G, Caron B, Fruchart JC, Fievet C. Immunological properties of apoB-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res.* 1993;34(5):719-728. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39693-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39693-0)
14. Rhoads JP, Lukens JR, Wilhelm AJ, Moore JL, Mendez-Fernandez Y, Kanneganti TD, et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein Immune Complex Priming of the Nlrp3 Inflammasome Involves TLR and FcγR Cooperation and Is Dependent on CARD9. *J Immunol.* 2017;198(5):2105-2114. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601563>
15. Orekhov AN, Oishi Y, Nikiforov NG, Zhelankin AV, Dubrovsky L, Sobenin IA, et al. Modified LDL Particles Activate Inflammatory Pathways in Monocyte-derived Macrophages: Transcriptome Analysis. *Curr Pharm Des.* 2018;24(26):3143-3151. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180911120039>
16. Tuñón J, Badimón L, Bochaton-Piallat ML, Cariou B, Daemen MJ, Egado J, et al. Identifying the anti-inflammatory response to lipid lowering therapy: a position paper from the working group on atherosclerosis and vascular biology of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 2019;115(1):10-19. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy293>
17. Roy P, Orecchioni M, Ley K. How the immune system shapes atherosclerosis: roles of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(4):251-265. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00584-1>
18. Rieckmann M, Delgobo M, Gaal C, Büchner L, Steinau P, Reshef D, et al. Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses. *J Clin Invest.* 2019;129(11):4922-4936. <https://doi.org/10.1172/jci123859>
19. Kyaw T, Loveland P, Kanellakis P, Cao A, Kallies A, Huang AL, et al. Alarmin-activated B cells accelerate murine atherosclerosis after myocardial infarction via plasma cell-immunoglobulin-dependent mechanisms. *Eur Heart J.* 2021;42(9):938-947. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa995>
20. Sage AP, Tsiantoulas D, Binder CJ, Mallat Z. The role of B cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(3):180-196. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0106-9>
21. Zernecke A, Winkels H, Cochain C, Williams JW, Wolf D, Soehnlein O, et al. Meta-Analysis of Leukocyte Diversity in Atherosclerotic Mouse Aortas. *Circ Res.* 2020;127(3):402-426. <https://doi.org/10.1161/circresaha.120.316903>
22. Ketelhuth DF, Hansson GK. Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):668-678. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306427>
23. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(7):387-401. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0352-5>
24. Kimura T, Kobiyama K, Winkels H, Tse K, Miller J, Vassallo M, et al. Regulatory CD4⁺ T Cells Recognize Major Histocompatibility Complex Class II Molecule-Restricted Peptide Epitopes of Apolipoprotein B. *Circulation.* 2018;138(11):1130-1143. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031420>
25. Yang TC, Chang PY, Lu SC. L5-LDL from ST-elevation myocardial infarction patients induces IL-1β production via LOX-1 and NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;312(2):H265-H274. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00509.2016>
26. Chang CK, Chen PK, Lan JL, Chang SH, Hsieh TY, Liao PJ, et al. Association of Electronegative LDL with Macrophage Foam Cell Formation and CD11c Expression in Rheumatoid Arthritis Patients. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 16;21(16):5883. <https://doi.org/10.3390/ijms21165883>
27. Luchetti F, Crinelli R, Nasoni MG, Benedetti S, Palma F, Fraternali A, et al. LDL receptors, caveolae and cholesterol in endothelial dysfunction: oxLDLs accomplices or victims? *Br J Pharmacol.* 2021;178(16):3104-3114. <https://doi.org/10.1111/bph.15272>
28. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2019;124(2):315-327. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>
29. Prasad A, Clopton P, Ayers C, Khera A, De Lemos JA, Witztum JL, et al. Relationship of Autoantibodies to MDA-LDL and ApoB-Immune Complexes to Sex, Ethnicity, Subclinical Atherosclerosis, and Cardiovascular Events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(6):1213-1221. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.117.309101>
30. Ascitto G, Dias NV, Edsfeldt A, Alm R, Fredrikson GN, Gonçalves I, et al. Low levels of IgG autoantibodies against the apolipoprotein B antigen p210 increases the risk of cardiovascular death after carotid endarterectomy. *Atherosclerosis.* 2015;239(2):289-294. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.023>
31. Kuznetsova LV, Babadzhan VD, Frolov VM, Kravchun PH, Kuznetsov HV, Kurchenko AI, et al. [Clinical and laboratory immunology]. Kuznetsova LV, editor. Kyiv; 2012. Ukrainian.
32. Hawley TS, Hawley RG, editors. *Flow Cytometry Protocols.* 4th ed. New York: Humana New York; 2017. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0>
33. Lunova HH, editor. [Clinical biochemistry]. 1st volume. Lviv; 2021. Ukrainian.
34. Lomakovskiy OM. [Relationship of dyslipidemia and oxidative stress with the state of humoral immune in patients with IHD with stable angina]. *Ukrainskyi revmatologichnyi zhurnal.* 2022;(88(2)):1-6. Ukrainian. <https://doi.org/10.32471/rheumatology.2707-6970.88.17167>
35. Bosmans LA, Bosch L, Kusters PJH, Lutgens E, Seijkens TTP. The CD40-CD40L Dyad as Immunotherapeutic Target in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2021;14(1):13-22. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-09994-3>

Immunological Reactivity and Intensity of Oxidative Stress in Stable Coronary Artery Disease

Tetiana I. Gavrilenko¹, Oleksandr M. Lomakovskiy¹, Olena A. Pidgaina¹, Olga V. Rasputniak², Nataliia O. Ryzhkova¹,
Natalia V. Grechkovskaya³

¹SI "National Scientific Center "The M.D. Strazhesko Institute of Cardiology, Clinical and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

²National Amosov Institute of Cardiovascular Surgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Abstract

The aim. To analyze the relationship between immune response factors and the intensity of oxidation of lipoproteins and proteins in patients with stable coronary artery disease (CAD) to clarify the pathogenesis of coronary atherosclerosis.

Materials and methods. A total of 179 patients with stable CAD of II-IV functional class, mean age 56 (49-62) years (main group) and 30 healthy individuals, mean age 49 (45-53) years (control group) were examined. The material for immunological research was peripheral venous blood. To determine the indicators of immunity, flow laser cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay were used. Spectrophotometric and fluorometric methods were used to determine the levels of intermediate and final oxidation products of lipids and proteins, as well as antioxidant protection enzymes in the blood serum and in atherogenic lipoproteins.

Results. A direct relationship between the activity of lipoprotein peroxidation and protein oxidation with a cell-type immune response and immune inflammation was revealed.

Conclusions. The high intensity of lipid peroxidation and protein oxidation in patients with stable CAD (stable angina pectoris) is combined with significant activation of the T-cell component of the immune response (in terms of the ratio of helper and cytotoxic subpopulations of T-lymphocytes, high concentrations of pro-inflammatory cytokines, the state of the CD40/CD40L system, the level of expression of the CD95 apoptosis marker on cells), which indicates interdependence of T-cell immunity and oxidative stress in the pathogenesis of atherosclerosis.

The dependence of the hyperproduction of pro-inflammatory cytokines by mononuclear blood cells on free radical oxidation of proteins, peroxidation of apoB proteins and the intensity of antiperoxide protection (catalase and superoxide dismutase enzymes) in patients with stable CAD indicates a contribution to the presence of oxidative stress and the development of immune inflammation.

A comprehensive study of the factors of immunological reactivity, the violation of which can lead to the development of immunopathological reactions, and the intensity of oxidation of lipoproteins and proteins in patients with stable CAD helps to clarify the pathogenetic relationship between chronic immune inflammation, endothelial dysfunction and oxidative stress, and also substantiates the expediency of general therapeutic approaches to the treatment of CAD.

Keywords: *coronary atherosclerosis, immunopathological reactions, immune inflammation, CD40/CD40L system, antiperoxide protection.*

Стаття надійшла в редакцію / Received: 01.02.2023

Після доопрацювання / Revised: 08.08.2023

Прийнято до друку / Accepted: 21.09.2023