

ИММУНОПАТОГЕНЕЗ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННО-ИММУННЫМ МИОКАРДИТОМ

Палеев Ф. Н.¹, Санина Н. П.¹, Макаров А. И.², Хишова Н. Н.¹, Москалец О. В.¹, Палеев Н. Р.¹

Цель. Изучить количественные параметры, особенности функционального состояния основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных инфекционно-иммунным миокардитом (ИИМ) и миокардитическим кардиосклерозом (МК) и особенности цитокинового профиля у этих больных.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 35 больных ИИМ и 39 больных МК. У 17 больных ИИМ отмечались выраженные симптомы сердечной недостаточности (СН) — III функциональный класс (ФК) по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA), у 18 пациентов с ИИМ признаки СН отсутствовали или были умеренно выражены (0-II ФК по NYHA). У 18 больных МК симптомы СН отсутствовали, а у 21 пациента выявлялись незначительные признаки СН (I ФК по NYHA). Контрольную группу составили 10 условно здоровых лиц.

Исследование популяционного и субпопуляционного состава и активационных маркеров лимфоцитов периферической крови проводили методом четырехцветной лазерной проточной цитометрии с использованием прибора FACSCalibur и соответствующих моноклональных антител (Becton Dickinson, США). Изучали средние значения концентрации цитокинов, характеризующих Th1-, Th2- и Th17-субпопуляции хелперных лимфоцитов. Определение концентрации цитокинов в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы PASW Statistics 18.

Результаты. Воспалительные заболевания миокарда характеризуются изменениями как врожденного, так и адаптивного иммунитета. При ИИМ и МК выявлено значительное уменьшение числа NKT-лимфоцитов, не зависящее от выраженности симптомов СН и продолжительности заболевания.

Признаки иммуноактивации в группе больных ИИМ характеризовались приростом экспрессии раннего активационного маркера CD25, который отмечен в первые 2 недели от начала заболевания. В последующем, к концу 1-го месяца и на 2-м месяце от начала заболевания, регистрировали прирост числа T- и не-T-лимфоцитов с признаками поздней активации, выявляемой по экспрессии антигена HLA-DR. Паттерн активационных маркеров различался у пациентов с разной степенью выраженности симптомов СН.

Концентрации интерферона- γ (ИФН- γ) и интерлейкина (ИЛ)-4 была более чем в 3 раза выше у пациентов с ИИМ по сравнению со здоровыми донорами. Выявлено почти 7-кратное увеличение уровня ИЛ-17А, а также концентраций эффекторных цитокинов Th17-субпопуляции — ИЛ-8 и гранулоцитарно-макрофагального колонистимулирующего фактора (ГМ-КСФ).

Уровень ИФН- γ достигал максимальных значений в первые 2 недели от начала заболевания. В последующем концентрация ИФН- γ снижалась. Напротив, сывороточная концентрация ИЛ-4 оказалась значительно повышенной к концу 1-го и на 2-м месяце от начала заболевания. Концентрации ИЛ-17А, ИЛ-8

и ГМ-КСФ в сыворотке крови были повышены во 2-ю неделю, к концу 1-го месяца и на 2-м месяце заболевания.

Концентрации Th17-цитокинов оказались существенно повышенными у больных МК. Уровень ИЛ-17А превышал показатель контрольной группы почти вдвое, ИЛ-8 — на 51%, а ГМ-КСФ — на 50%. Сывороточные уровни ИЛ-4, а также ИЛ-17А, ИЛ-8 и ГМ-КСФ оказались повышенными в подгруппе больных МК со сроком заболевания менее 6 месяцев.

Заключение. Нарушения противoinфекционного иммунитета и механизмов самоограничения иммунных реакций играют важную роль в возникновении и прогрессировании поражений миокарда воспалительной природы.

Российский кардиологический журнал 2016, 1 (129): 32–40

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-1-32-40>

Ключевые слова: инфекционно-иммунный миокардит, миокардитический кардиосклероз, лимфоциты, иммуноактивация.

¹ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского, Москва; ²ГБУЗ Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия.

Палеев Ф. Н.* — д.м.н., профессор РАН, директор, Санина Н. П. — д.м.н., профессор кафедры терапии факультета усовершенствования врачей, Макаров А. И. — к.м.н., н.с., Хишова Н. Н. — аспирант кафедры терапии факультета усовершенствования врачей, Москалец О. В. — к.м.н., г.н.с. лаборатории иммунологии, Палеев Н. Р. — академик РАН, профессор, зав. кафедрой терапии факультета усовершенствования врачей.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

filipp.paleev@monikiweb.ru

ИИМ — инфекционно-иммунный миокардит, МК — миокардитический кардиосклероз, СН — сердечная недостаточность, ФК — функциональный класс, NYHA — New-York Heart Association (Нью-Йоркской кардиологической ассоциации), Th — T-helper (Т-хелпер), NKT — Natural killers Т-лимфоциты (Естественные киллеры), CD — Cluster of differentiation (Кластер дифференцировки), HLA-DR — Human Leukocyte Antigen — antigen D Related, ИФН — интерферон, ИЛ — интерлейкин, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

Рукопись получена 14.12.2015

Рецензия получена 16.12.2015

Принята к публикации 23.12.2015

IMMUNOPATHOGENESIS OF HEART FAILURE IN PATIENTS WITH INFECTIVE-IMMUNE MYOCARDITIS

Paleev F. N.¹, Sanina N. P.¹, Makarkov A. I.², Khishova N. N.¹, Moskaletz O. V.¹, Paleev N. R.¹

Aim. To study quantitative parameters, specifics of functional state of the main subpopulations of peripheral blood lymphocytes of the infective-immune myocarditis patients (IIM) and postmyocarditis cardiosclerosis (PMC), and specifics of cytokine profile.

Material and methods. Totally, 35 IIM patients included, and 39 with PMC. In 17 patients with IIM there was significant heart failure (HF) — III functional class (FC) by New-York Heart Association (NYHA), in 18 patients with IIM there were no signs of HF, or mild signs (0-II FC by NYHA). In 18 patients with PMC there were no signs of HF, and in 21 — there was I FC by NYHA. The controls were 10 formally healthy persons. Study of population and subpopulation contents, and lymphocytes activation markers of peripheral blood, was done with four-color laser flow cytometry using

FACSCalibur equipment and relevant monoclonal antibodies (Becton Dickinson, USA). We studied the mean cytokines concentrations characterizing Th1-, Th2- and Th17- subpopulations of the helper lymphocytes. Measurement of serum cytokines was done with the method solid-phase immune-enzyme assay with LLC "Vectro-Best" (Russia) media. Statistics was done with software PASW Statistics 18.

Results. Inflammatory diseases of myocardium show the deviations of native, as acquired immunity. In IIM and PMC there was significant decrease of NKT-lymphocytes, not related to the severity of HF signs and durations of the disease. Immunity activation signs in IIM group showed the increase of the early activator marker CD25 expression activation, that was marked during the first 2 weeks from the disease onset. Following, by the end of the 1st month and on the 2nd month from

the disease onset, the increase of T- and non-T-lymphocytes was found with the signs of delayed activation, revealed by HLA-DR antigen expression. The activator marker patterns were differ in patients with different grade of HF severity.

Concentration of interferon- γ (IFN- γ) and interleukine (IL)-4 was more than 3 times higher in IIM patients comparing to controls. There was more than 7-times higher increase of IL-17A, and concentrations of effector cytokines of Th17-subpopulation — IL-8 and granulocyte-macrophagal colony-stimulating factor (GM CSF).

The level of IFN- γ reached maximal levels during the first 2 weeks from the disease onset. Later, IFN- γ concentration declined. Opposite, serum level of IL-4 was significantly increased by the end of the 1st and on the 2nd month from disease onset. Concentrations of IL-17A, IL-8 and GM CSF in blood serum were increased during the whole 2nd week, by the end of the 1st month and on the 2nd month.

Th17-cytokines concentrations were significantly increased in PMC patients. Level of IL-17A was higher than in controls almost two times, IL8 — by 51%, GM CSF — by

50%. Serum levels of IL-4, and IL-17A, IL-8 and GM CSF were higher in subgroup of PMC patients with the disease duration less than 6 months.

Conclusion. Disorders of anti-infection immunity and mechanisms of self-restriction of immune reactions do play important role in development of myocardium damage of inflammatory origin.

Russ J Cardiol 2016, 1 (129): 32–40

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-1-32-40>

Key words: infective-immune myocarditis, postmyocarditis cardiosclerosis, lymphocytes, immune activation.

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow; ²Center for Family Care and Reproduction of the Healthcare Department of Moscow, Moscow, Russia.

Миокардиты представляют собой поражение сердечной мышцы преимущественно воспалительного характера, обусловленное непосредственным или опосредованным через иммунные механизмы воздействием инфекции, химических и физических факторов, а также возникающее при аллергических и аутоиммунных заболеваниях. Наиболее частой причиной миокардитов является вирусная инфекция. Исследования последних лет убедительно показали ключевую роль иммунных механизмов в возникновении и прогрессировании поражения миокарда [1, 2].

При доброкачественном течении инфекционно-иммунного миокардита (ИИМ) цитотоксические реакции направлены на элиминацию инфицированных кардиомиоцитов с закономерной выработкой антител к вирусам [3, 4]. У больных со злокачественным течением ИИМ обнаруживается выраженная активация цитотоксических иммунных механизмов в сочетании с выработкой большого количества аутоантител, что указывает на цитолитическое аутоиммунное повреждение неинфицированных кардиомиоцитов [5, 6]. Цитотоксические иммунные реакции, обеспечивающие на начальном этапе элиминацию чужеродного — вирусного или бактериального — генома, становятся затем основным фактором повреждения миокарда [4, 7, 8]. Гуморальный ответ вносит свою лепту в нарушение взаимодействия сократительных белков миокарда, дисрегуляцию рецепторного аппарата кардиомиоцитов и энергетического обмена миокарда [9, 10].

Применительно к вирусным миокардитам необходимо учитывать баланс иммунных реакций, направленных на элиминацию инфекционного патогена, и аутоагрессивных иммунных факторов, оказывающих повреждающее воздействие на миокард. Известно, что на ранних стадиях заболевания доминируют Th1-опосредованные иммунорегуляторные механизмы, обеспечивающие эффективную работу клеточного звена иммунитета; в последующем возрастает активность Th2-клеток, ответственных за гуморальный иммунитет, благодаря чему ИИМ приобретает затяжное или хронически-рецидивирующее течение [11, 12].

Исследование цитокинового профиля является одним из важнейших методов оценки функционального баланса основных субпопуляций Т-хелперных (Th) лимфоцитов: Th1, Th2 и Th17. Несмотря на известные ограничения, определение концентраций цитокинов в сыворотке периферической крови считается надежным иммунодиагностическим инструментом [2, 13].

О функциональном состоянии Th1-субпопуляции принято судить по продукции иммунокомпетентными клетками интерферона- γ (ИФН- γ). Интерлейкин (ИЛ)-4 служит маркером Th2-субпопуляции лимфоцитов [2, 13]. ИЛ-17А — основной цитокин Th17-субпопуляции Т-хелперов [13]. Однако учитывая пластичность Th17-субпопуляции, ее способность к образованию промежуточных Th1/Th17, Th2/Th17 и Treg/Th17 клеточных форм, а также усиление или, напротив, угнетение продукции отдельных Th17-цитокинов в условиях меняющегося клеточного микроокружения, представляется целесообразным наряду с ИЛ-17А оценивать концентрации эффекторных цитокинов Th17-зависимых иммунных механизмов — таких, как ИЛ-8 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) [13].

Комплексное изучение состояния различных звеньев иммунитета при миокардите открывает перспективы для выявления высокочувствительных и специфических индикаторов воспалительного поражения миокарда и определения их места в диагностическом алгоритме.

Исследование поверхностного фенотипа лимфоцитов периферической крови служит надежным и высокоинформативным инструментом иммунодиагностики, позволяющим оценить как количественный состав, так и особенности функционального состояния иммунокомпетентных клеток [15].

Материал и методы

В исследовании приняли участие 35 больных ИИМ и 39 больных миокардитическим кардиоскле-

Таблица 1
Характеристика популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов и экспрессия активационных маркеров и маркера апоптоза лимфоцитами периферической крови больных с воспалительными поражениями миокарда

Маркер	Инфекционно-иммунный миокардит	Миокардитический кардиосклероз	Контрольная группа
CD3 ⁺	71,3±1,01	71,2±1,13	70,6±1,21
CD3 ⁺ CD4 ⁺	41,8±1,11	42,9±1,41	40,1±1,79
CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,6±1,00	25,5±1,31	27,9±2,06
ИРИ	1,69±0,08	1,87±0,17	1,73±0,17
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺	13,1±0,77	15,6±1,08 ^{††}	16,0±1,33
CD3 ⁺ CD16/56 ⁻	5,3±0,47 [†]	4,3±0,51 [†]	13,9±2,02
CD19 ⁺	12,4±0,66*	10,4±0,74	9,4±0,39
CD4 ⁺ CD25 ⁺	5,7±0,73*	3,4±0,23	3,1±0,18
CD3 ⁺ CD25 ⁺	5,2±0,63	3,5±0,26	3,2±0,22
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	7,6±0,70	3,7±0,41 [†]	6,1±0,89
CD3 ⁺ HLA-DR ⁻	15,6±0,82**	12,4±1,00	11,0±0,42
CD3 ⁺ CD95 ⁺	23,1±1,81***	13,4±1,33** [†]	7,7±1,06

Примечание: данные представлены как средние значения (M) и стандартная ошибка среднего (±m), * — p<0,05, по сравнению с контрольной группой, ** — p<0,01, по сравнению с контрольной группой, *** — p<0,001, по сравнению с контрольной группой, † — p<0,001, по сравнению с группой больных ИИМ, †† — p<0,05, по сравнению с группой больных ИИМ.

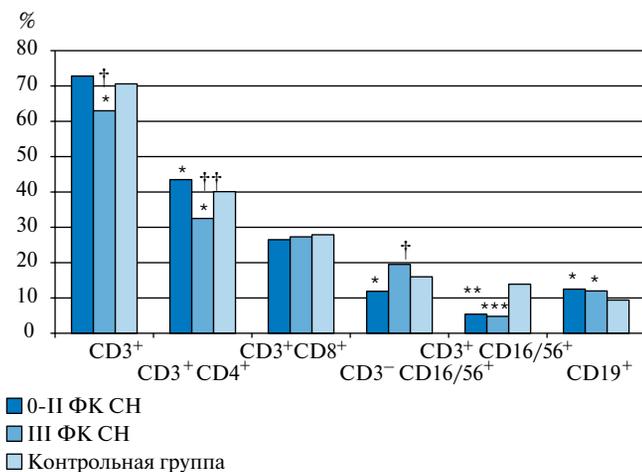


Рис. 1. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у больных ИИМ с отсутствием или умеренной выраженностью симптомов СН (0-II ФК СН) и выраженными симптомами СН (III ФК СН).

Примечание: * — p<0,05, по сравнению с контрольной группой, ** — p<0,001, по сравнению с контрольной группой, *** — p<0,01, по сравнению с контрольной группой, † — p<0,01, по сравнению с подгруппой больных с 0-II ФК СН, †† — p<0,001, по сравнению с подгруппой больных с 0-II ФК СН.

розом (МК). У 17 больных ИИМ отмечались выраженные симптомы сердечной недостаточности (СН) — III функциональный класс (ФК) по классификации NYHA. У 18 пациентов с ИИМ признаки СН отсутствовали или были умеренно выражены (0-II ФК по NYHA). У 18 больных МК симптомы СН отсутствовали, а у 21 пациента выявлялись незначи-

тельные признаки СН (I ФК по NYHA). Контрольную группу составили 10 условно здоровых лиц.

Исследование популяционного и субпопуляционного состава и активационных маркеров лимфоцитов периферической крови проводили методом четырехцветной лазерной проточной цитометрии с использованием прибора FACSCalibur и соответствующих моноклональных антител (Becton Dickinson, США).

Определение концентрации цитокинов в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО “Вектор-Бест” (Россия).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы PASW Statistics 18. Для определения статистической обоснованности различия исследуемых групп применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для оценки характера, силы и достоверности связи отдельных показателей использовали коэффициент линейной корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлена характеристика популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов, а также экспрессия активационных маркеров у пациентов с ИИМ и МК. При анализе зависимости популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови больных ИИМ от выраженности симптомов СН были выявлены разнонаправленные изменения числа Т-лимфоцитов в группах по выраженности СН (рис. 1).

У пациентов с умеренными симптомами СН был выявлен повышенный уровень Т-лимфоцитов (CD3⁺) и Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) при одновременном достоверном снижении уровня NK-клеток (CD3⁻CD16/56⁺). У пациентов с выраженной СН наблюдалась противоположная картина — достоверное снижение уровня Т-лимфоцитов и Т-хелперов и повышение уровня NK-клеток (лимфоидные клетки, формирующие неспецифическую защиту против патогенов).

Количество CD3⁺CD16/56⁺ NKT-клеток было существенно сниженным как в группе пациентов с отсутствием или умеренной выраженностью симптомов СН (5,4%, p<0,001), так и среди больных с выраженными симптомами СН (4,8%, p<0,01). Уровень CD19⁺ В-лимфоцитов оказалось достоверно повышенным у пациентов обеих групп.

Анализ показателей иммунологической активации от степени тяжести симптомов СН у больных ИИМ показал, что у пациентов с отсутствием или умеренной выраженностью симптомов СН (0-II ФК СН) повышен уровень активированных Т-клеток, экспрессирующих антиген CD25. Это касалось как CD3⁺CD25⁺-лимфоцитов, так и CD4⁺CD25⁺ (рис. 2).

В группе больных с выраженными симптомами СН (III ФК) содержание CD3⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺-клеток не превышало соответствующие показатели контрольной группы, составив 2,7 и 2,5%, соответственно, ($p>0,05$). При этом число CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов было достоверно повышено у больных с выраженными симптомами СН.

Интересным представляется увеличение числа CD3⁺HLA-DR⁺-клеток при ИИМ. Эту клеточную популяцию принято рассматривать как активированные не-T-клетки, под которыми подразумевают В- и НК-лимфоциты. Принимая во внимание рост числа В-лимфоцитов у больных ИИМ, можно говорить об активации не только клеточного, но и гуморального иммунитета. В пользу данного предположения свидетельствуют наличие положительной корреляционной связи между числом CD19⁺ и CD3⁺HLA-DR⁺-клеток в группе больных с воспалительными поражениями миокарда ($r=0,52$, $p<0,001$) и отсутствие связи между этими показателями в контрольной группе [13].

Число Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер апоптоза CD95, у больных ИИМ оказалось в 3 раза выше, чем в контрольной группе. При этом количество клеток, несущих маркер поздней активации HLA-DR, не отличалось от контрольного показателя. Последнее наблюдение позволяет предположить дисгармоничный характер иммуноактивации у больных ИИМ. Количество CD3⁺CD95⁺-лимфоцитов в группе пациентов с отсутствием или умеренной выраженностью симптомов СН превышало показатель контрольной группы в 3 раза ($p<0,001$), а в группе с выраженными симптомами СН — в 3,5 раза ($p<0,05$).

Количество активированных не-T-клеток (фенотип CD3⁺HLA-DR⁺) составило 14,3% в группе пациентов с отсутствием или умеренной выраженностью симптомов СН ($p<0,01$ по сравнению с контрольной группой) и 22,8% — в группе больных с выраженными симптомами СН ($p<0,001$, по сравнению с контрольной группой). Различие между группами с разной степенью выраженности симптомов СН оказалось статистически достоверным ($p<0,01$), что указывает на более высокую степень активации механизмов гуморального иммунитета у пациентов с тяжелой СН.

Для ИИМ характерна активация как Th1-, так и Th2-зависимых иммунных реакций, что согласуется с представлениями о роли Т-клеточных и гуморальных механизмов в патогенезе воспалительных поражений миокарда [14]. В таблице 2 представлены средние концентрации цитокинов, характеризующих Th1-, Th2- и Th17-субпопуляции хелперных лимфоцитов, у больных ИИМ и МК. Рост концентрации ИФН- γ составил 124% по сравнению с контрольной группой ($p<0,001$); концентрация ИЛ-4 также увеличивалась более чем в 3 раза по сравнению с уровнем

Таблица 2

Характеристика цитокинового профиля Th1-, Th2- и Th17-субпопуляций лимфоцитов у больных с воспалительными поражениями миокарда

Цитокин	Инфекционно-иммунный миокардит	Миокардитический кардиосклероз	Контрольная группа
ИФН- γ , пг/мл	112,5 \pm 12,27*	50,2 \pm 9,21 [†]	53,8 \pm 9,64
ИЛ-4, пг/мл	55,6 \pm 8,01**	21,2 \pm 4,22 ^{††}	14,6 \pm 5,12
ИЛ-17А, пг/мл	63,8 \pm 12,25*	27,3 \pm 9,64*** ^{†††}	9,3 \pm 2,74
ИЛ-8, пг/мл	16,9 \pm 2,76*	6,2 \pm 2,11*** ^{†††}	4,1 \pm 1,76
ГМ-КСФ, пг/мл	0,8 \pm 0,11**	0,6 \pm 0,02** ^{††}	0,4 \pm 0,02

Примечание: данные представлены как средние значения (M) и стандартная ошибка среднего ($\pm m$), * — $p<0,001$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p<0,01$ по сравнению с контрольной группой, *** — $p<0,05$, по сравнению с контрольной группой, [†] — $p<0,001$, по сравнению с группой больных ИИМ, ^{††} — $p<0,05$, по сравнению с группой больных ИИМ, ^{†††} — $p<0,01$, по сравнению с группой больных ИИМ.

Сокращения: ИФН- γ — интерферон- γ , ИЛ — интерлейкин, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

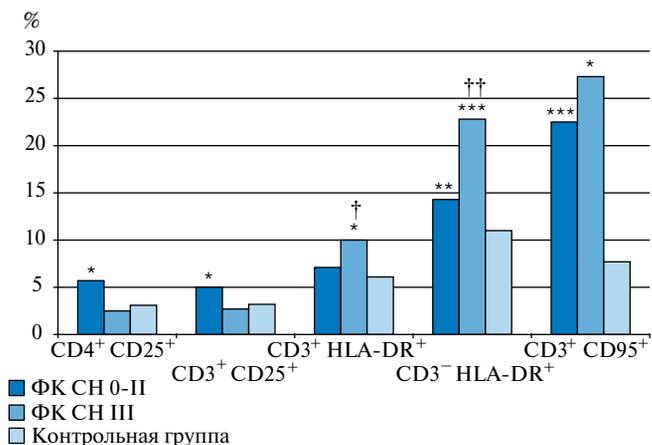


Рис. 2. Экспрессия активационных маркеров и маркера апоптоза лимфоцитами больных ИИМ с отсутствием или умеренной выраженностью симптомов СН (0-II ФК СН) и выраженными симптомами СН (III ФК СН).

Примечание: * — $p<0,05$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p<0,01$, по сравнению с контрольной группой, *** — $p<0,001$, по сравнению с контрольной группой, [†] — $p<0,05$, по сравнению с подгруппой больных с ФК СН 0-II, ^{††} — $p<0,01$, по сравнению с подгруппой больных с ФК СН 0-II.

цитокина в сыворотке крови здоровых доноров ($p<0,01$).

Наши исследования показали, что концентрация ИЛ-17А в сыворотке крови больных ИИМ повышена почти в 7 раз, что указывает на участие Th17-опосредованных иммунных механизмов в патогенезе заболевания. В поддержку данной гипотезы также свидетельствует увеличение сывороточных концентраций эффекторных цитокинов Th17-субпопуляции — ИЛ-8 и ГМ-КСФ — по сравнению с контрольной группой на 312% ($p<0,001$) и 100% ($p<0,01$), соответственно.

Нами был произведен анализ особенностей цитокинового профиля у больных ИИМ с различной сте-

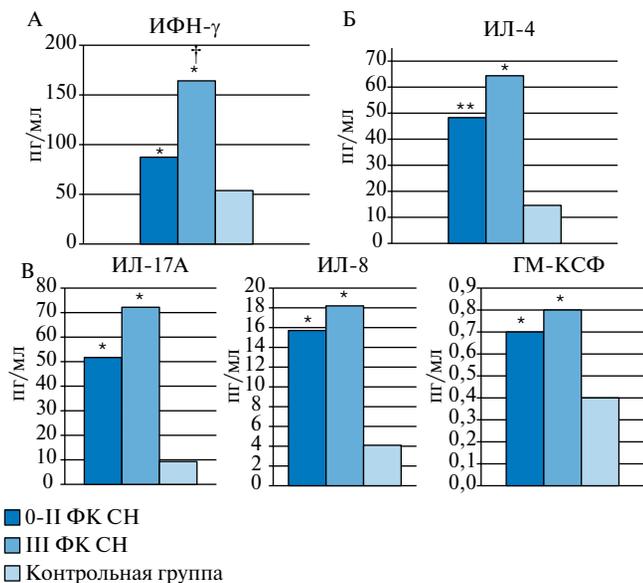


Рис. 3. Концентрации Th1- (А), Th2- (Б) и Th17-цитокинов (В) в сыворотке крови больных ИИМ с отсутствием или умеренной выраженностью симптомов СН (0-II ФК СН) и выраженными симптомами СН (III ФК СН).

Примечание: * — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой, † — $p < 0,05$, по сравнению с подгруппой больных с 0-II ФК СН.

Сокращения: ИФН-γ — интерферон-γ, ИЛ — интерлейкин, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

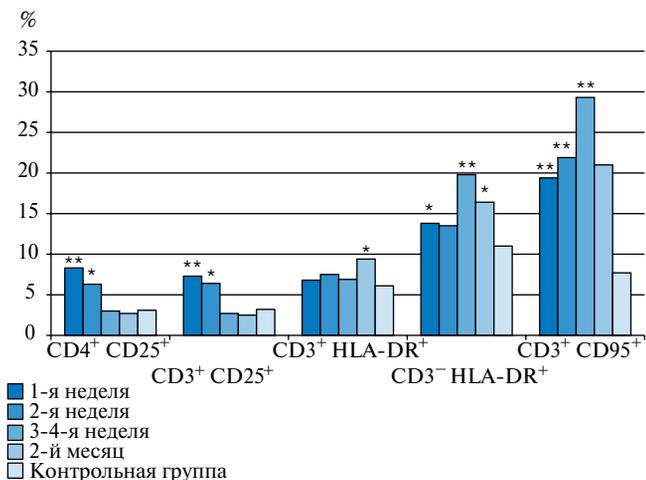


Рис. 4. Экспрессия активационных маркеров и маркера апоптоза лимфоцитами больных ИИМ в зависимости от сроков заболевания.

Примечание: * — $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой.

пенью выраженности симптомов СН, результаты которого представлены на рисунке 3. В группе пациентов с отсутствием или умеренной тяжестью симптомов СН (0-II ФК СН) концентрация ИФН-γ оказалась достоверно ниже, чем у пациентов с выраженной СН (III ФК СН). Средний уровень цитокина составил 87,4 пг/мл по сравнению со 164,2 пг/мл в группе больных более тяжелой СН ($p < 0,05$). Напротив, средние концентрации ИЛ-4 сущест-

венно не различались в группах больных с отсутствием или умеренной тяжестью симптомов СН (0-II ФК СН) и с выраженными симптомами СН (III ФК СН), составив 48,3 и 64,4 пг/мл, соответственно, ($p > 0,05$) [15].

Была выявлена тенденция к росту концентрации ИЛ-17А, а также ИЛ-8 и ГМ-КСФ у больных с более тяжелым ФК СН, однако различие не было статистически значимым из-за значительного разброса индивидуальных показателей. В частности, уровень ИЛ-17А у больных с отсутствием или умеренной тяжестью симптомов СН составил 51,7 пг/мл, а у пациентов с симптомами III ФК СН — 72,2 пг/мл ($p > 0,05$). Сывороточная концентрация ИЛ-8 достигала 18,2 пг/мл в группе больных с III ФК СН и лишь 15,7 пг/мл у пациентов с 0-II ФК СН ($p > 0,05$). Наконец, концентрация ГМ-КСФ составила 0,7 пг/мл в группе пациентов с отсутствием или умеренной тяжестью симптомов СН и 0,8 — у больных с выраженными симптомами СН ($p > 0,05$). Эти наблюдения не позволяют исключить патогенетическую роль Th17-зависимых механизмов иммунорегуляции в прогрессировании симптомов СН у больных ИИМ, однако для проверки гипотезы необходимо проведение дополнительных исследований.

Нами был проведен анализ зависимости показателей иммунной системы от сроков заболевания (рис. 2). Наиболее существенно изменялось число CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов: в 1-ю неделю содержание в крови хелперных клеток возрастало до 45,6% ($p < 0,05$, по сравнению с показателем контрольной группы), во 2-ю неделю оно все еще оставалось несколько выше, чем в контроле (43,5%, $p > 0,05$), однако к концу 1-го месяца и на 2-й месяц от начала заболевания возвращалось к нормальному уровню и даже демонстрировало тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой (39,6 и 38,2%, соответственно, $p > 0,05$).

Содержание цитотоксических CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, как и общее число Т-клеток, существенно не зависело от сроков заболевания; величина ИРИ также достоверно не менялась.

Число CD19⁺ В-лимфоцитов демонстрировало тенденцию к повышению в 1-й месяц от начала заболевания, и во 2-й половине месяца было достоверно выше, чем в контрольной группе, составив 14,3% ($p < 0,01$).

Мы также выявили достоверное снижение числа NK-клеток во 2-ю неделю от начала заболевания до 10,7% ($p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой). Число NKT-клеток было сниженным и не зависело от сроков заболевания: 5,0% в 1-ю неделю ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой), 4,6% — во 2-ю неделю ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой), 6,5% — в конце 1-го месяца ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой)

и 5,2% — во 2-м месяце от начала заболевания ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой).

Активационный профиль лимфоцитов периферической крови больных ИИМ также зависел от сроков заболевания (рис. 4). Признаки ранней активации иммунокомпетентных клеток были наиболее выражены в 1-ю неделю заболевания. Количество $CD4^+CD25^+$ -клеток составило 8,3% ($p < 0,001$ по сравнению с показателем контрольной группы), а количество $CD3^+CD25^+$ -лимфоцитов — 7,3% ($p < 0,001$ по сравнению с показателем контрольной группы). На 2-й неделе заболевания показатели ранней активации Т-клеточного иммунитета также были повышены: число $CD4^+CD25^+$ -клеток составило 6,3% ($p < 0,05$, по сравнению с показателем контрольной группы), а $CD3^+CD25^+$ -клеток — 6,4% ($p < 0,05$, по сравнению с показателем контрольной группы). Позднее число клеток, экспрессирующих маркеры $CD4^+CD25^+$ и $CD3^+CD25^+$, не отличалось от показателей контрольной группы.

Число Т-лимфоцитов, несущих признаки поздней активации (фенотип $CD3^+HLA-DR^+$) не отличалось от показателя контрольной группы в 1-й месяц от начала заболевания. Однако на 2-м месяце показатель возрастал до 9,4% ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой).

Количество активированных не-Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^-HLA-DR^+$ повышалось уже в 1-ю неделю от начала заболевания, составляя в среднем 13,8% ($p < 0,01$, по сравнению с показателем контрольной группы). Однако наибольшей величины данный показатель достигал в конце 1-го месяца (19,8%, $p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой) и во 2-м месяце от начала заболевания (16,4%, $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой).

Количество Т-лимфоцитов, несущих маркер готовности к апоптозу $CD95$, было повышено у всех больных ИИМ: 19,5% на 1-й неделе заболевания ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой), 21,9% на 2-й неделе ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой) и 29,3% в конце 1-го месяца ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой). На 2-м месяце от начала заболевания имела место тенденция к увеличению средней величины показателя до 21,0%, не достигшая уровня статистической значимости из-за значительного разброса индивидуальных показателей.

Представляют интерес результаты анализа особенностей цитокинового профиля сыворотки крови больных ИИМ в зависимости от сроков заболевания. Как видно из рисунка 5, концентрация ИФН- γ — основного цитокина Th1-субпопуляции лимфоцитов — достигала максимальных значений в первые 2 недели от начала заболевания. В 1-ю неделю средняя концентрация цитокина составила 87,2 пг/мл ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой), а во 2-ю

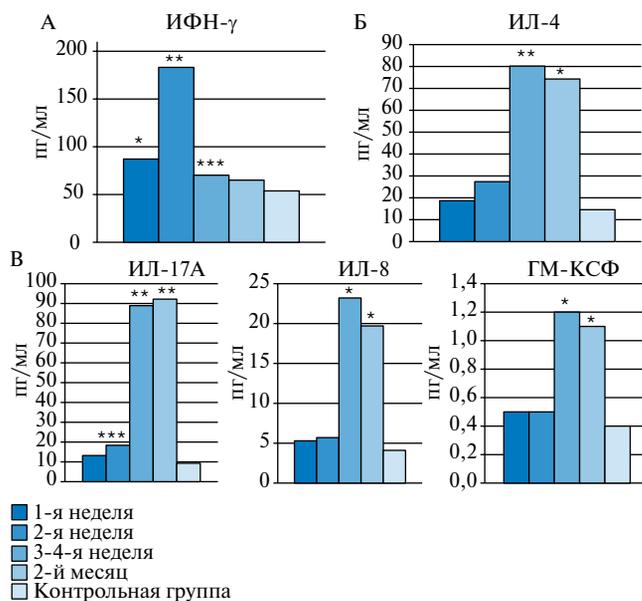


Рис. 5. Концентрации Th1- (А), Th2- (Б) и Th17-цитокинов (В) в сыворотке крови больных ИИМ в зависимости от сроков заболевания.

Примечание: * — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой, *** — $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой.

Сокращения: ИФН- γ — интерферон- γ , ИЛ — интерлейкин, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

неделю — 183,1 пг/мл ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой). В последующем концентрация ИФН- γ снижалась, достигая 70,2 пг/мл в конце 1-го месяца заболевания ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой) и 65,1 пг/мл на 2-м месяце от начала заболевания (отличие от показателя контрольной группы статистически недостоверно). Таким образом, можно заключить, что Th1-опосредованные иммунные механизмы играют ключевую роль в остром периоде воспаления миокарда.

Напротив, сывороточные концентрации ИЛ-4, характеризующие функциональное состояние Th2-субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов, демонстрировали лишь тенденцию к повышению в 1-ю неделю (18,7 пг/мл, $p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой) и 2-ю неделю (27,4 пг/мл, $p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой) от начала заболевания. Однако к концу 1-го месяца концентрация ИЛ-4 оказалась значительно повышенной, составив в среднем 80,2 пг/мл ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой). На 2-м месяце от начала заболевания уровень ИЛ-4 составил 74,3 пг/мл ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой). Можно предположить, что Th2-зависимые иммунные процессы “включаются” к концу 1-го месяца, обуславливая вовлечение гуморальных иммунопатологических механизмов, что согласуется с ростом числа активированных не-Т-лимфоцитов (фенотип $CD3^-HLA-DR^+$) в этом периоде заболевания.

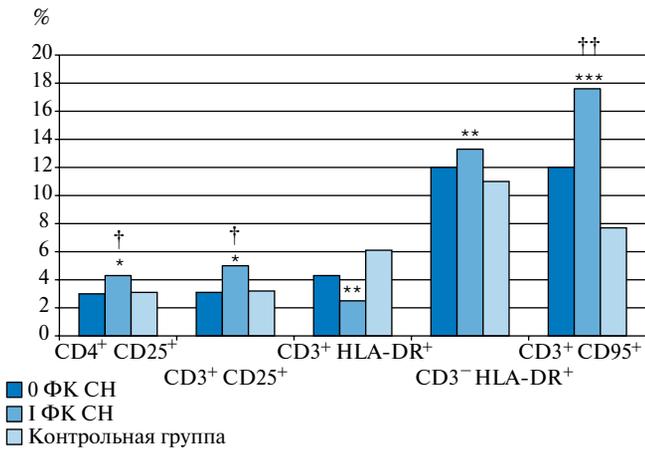


Рис. 6. Экспрессия активационных маркеров и маркера апоптоза лимфоцитами больных МК с отсутствием (0 ФК СН) или незначительной выраженностью (1 ФК СН) симптомов СН.

Примечание: * — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой, *** — $p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой, † — $p < 0,01$, по сравнению с подгруппой больных с 0 ФК СН, †† — $p < 0,05$, по сравнению с подгруппой больных с 0 ФК СН.

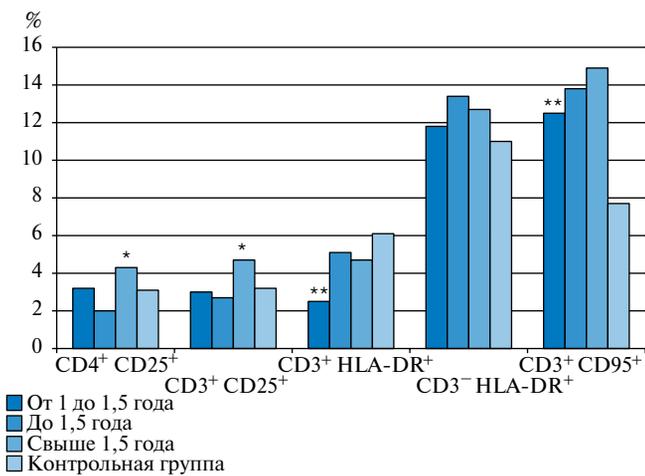


Рис. 7. Экспрессия активационных маркеров и маркера апоптоза лимфоцитами больных МК в зависимости от сроков заболевания.

Примечание: * — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой.

Концентрация ИЛ-17А в сыворотке крови демонстрировала тенденцию к увеличению в 1-ю неделю (13,2 пг/мл, $p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой) и была умеренно повышенной во 2-ю неделю от начала заболевания (18,4 пг/мл, $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой). К концу 1-го месяца и на 2-м месяце заболевания имело место значительное повышение концентраций ИЛ-17А до 88,9 пг/мл ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой) и до 92,2 пг/мл ($p < 0,001$, по сравнению с контрольной группой), соответственно.

Изменения концентраций ИЛ-8 и ГМ-КСФ имели сходный характер. Так, уровень ИЛ-8 был нормальным в 1-ю (5,3 пг/мл, $p > 0,05$, по сравнению с конт-

рольной группой) и 2-ю (5,7 пг/мл, $p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой) неделю от начала заболевания. В конце 1-го месяца имел место существенный рост содержания ИЛ-8 в сыворотке крови больных ИИМ; средняя концентрация цитокина достигала 23,2 пг/мл ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой). На 2-м месяце от начала заболевания уровень ИЛ-8 также был значительно повышен, составляя 19,7 пг/мл ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой).

Сходным образом сывороточная концентрация ГМ-КСФ не отличалась от показателя контрольной группы, составив 0,5 пг/мл в 1-ю и во 2-ю неделю от начала заболевания ($p > 0,05$). К концу 1-го месяца уровень цитокина возрастал до 1,2 пг/мл ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой) и оставался повышенным (1,1 пг/мл, $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой) на 2-м месяце от начала заболевания.

Полученные результаты указывают на вероятную патогенетическую роль Th17-лимфоцитов при воспалительных поражениях сердечной мышцы, а динамика изменения концентраций Th17-цитокинов не позволяет исключить их участия в процессах ремоделирования миокарда.

Цитокиновый профиль сыворотки крови больных МК демонстрировал ряд особенностей, отличающих его от показателей как при ИИМ, так и контрольной группы.

Содержание ИФН- γ было практически таким же, как в контрольной группе, и достоверно ниже, чем у больных ИИМ. Уровень ИЛ-4 был несколько выше, чем в контрольной группе, однако различие было статистически недостоверным из-за значительного разброса индивидуальных показателей. Таким образом, Th1- и Th2-опосредованные иммунные механизмы, играющие важную роль в патогенезе ИИМ, едва ли имеют существенное значение для прогрессирования склеротических изменений миокарда.

При МК в целом отсутствовали признаки активации иммунной системы. Число $CD3^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^+$ -клеток не отличалось от соответствующих показателей контрольной группы, а количество $CD3^+HLA-DR^+$ -клеток демонстрировало тенденцию к снижению. При этом, однако, доля клеток с фенотипом $CD3^+CD95^+$ оставалась повышенной, хотя и не столь значительно, как при ИИМ (рис. 6). Выявленные умеренные признаки активации иммунной системы у определенной группы пациентов с МК позволяют предположить, что иммунные механизмы продолжают участвовать в патогенезе поражения миокарда у лиц, у которых ИИМ клинически завершился формированием кардиосклероза. При этом симптомы СН могут быть связаны, в том числе, с сохраняющейся активацией иммунокомпетентных клеток.

Умеренные признаки иммуноактивации выявлялись в группе больных МК со сроком заболевания свыше 1 года (рис. 7).

Концентрации Th17-цитокинов у больных с МК оказались существенно повышенными. Уровень ИЛ-17А превышал показатель контрольной группы почти вдвое ($p < 0,01$), ИЛ-8 — на 51% ($p < 0,05$), а ГМ-КСФ — на 50% ($p < 0,01$). Следовательно, при МК роль Th17-опосредованных иммунных механизмов в ремоделировании миокарда и формировании склеротических изменений представляется вероятной и требует дальнейшего изучения.

У больных МК мы также проанализировали зависимость сывороточных концентраций цитокинов от ФК СН. Статистически значимых различий между подгруппами выявлено не было. Как видно из данного рисунка 8, концентрация ИФН- γ составила 48,4 пг/мл у больных без признаков СН (0 ФК СН) и 62,4 пг/мл ($p > 0,05$) у больных с незначительно выраженными симптомами СН (I ФК СН). Уровень ИЛ-4 у больных без признаков СН составил 19,7 пг/мл и в подгруппе с I ФК СН — 25,1 пг/мл ($p > 0,05$).

При МК концентрации ИЛ-17А были повышены по сравнению с контрольной группой, составив 28,8 пг/мл у больных без признаков СН ($p < 0,05$, по сравнению с показателем контрольной группы) и 25,5 пг/мл у пациентов с I ФК СН ($p < 0,05$, по сравнению с показателем контрольной группы), однако различия между подгруппами также отсутствовали ($p > 0,05$).

Концентрации ИЛ-8 не различались между подгруппами и были близки к величине показателя в контрольной группе: 6,5 пг/мл у больных с МК без признаков СН ($p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой) и 6,0 пг/мл у пациентов с I ФК СН ($p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой). Наконец, уровни ГМ-КСФ также были повышены в обеих подгруппах по сравнению с контрольным значением, но не различались между собой. Содержание ГМ-КСФ в крови пациентов с МК, у которых отсутствовали симптомы СН, составило 0,6 пг/мл ($p < 0,01$, по сравнению с показателем контрольной группы), так же, как и у больных МК с I ФК СН ($p < 0,05$, по сравнению с показателем контрольной группы).

Результаты анализа зависимости сывороточных концентраций цитокинов от сроков заболевания у больных МК представлены на рисунке 9. Концентрация ИФН- γ у пациентов в подгруппе до 6 месяцев от начала заболевания составила 47,1 пг/мл ($p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой), в подгруппе с продолжительностью заболевания от 6 месяцев до 1 года — 58,1 пг/мл ($p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой), и в подгруппе со сроками заболевания свыше 1 года — 52,7 пг/мл ($p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой).

Сывороточный уровень ИЛ-4 оказался повышенным в подгруппе больных МК со сроком заболевания

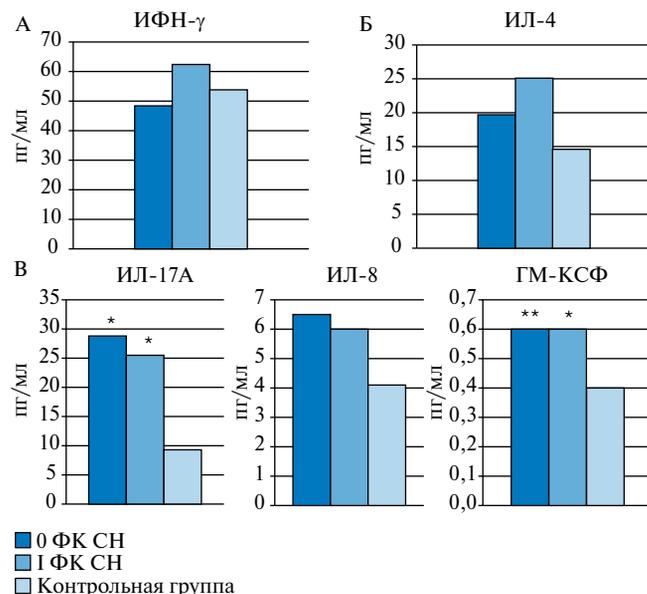


Рис. 8. Концентрации Th1- (А), Th2- (Б) и Th17-цитокинов (В) в сыворотке крови больных МК с отсутствием (0 ФК СН) или незначительной выраженностью (I ФК СН) симптомов СН.

Примечание: * — $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой.

Сокращения: ИФН- γ — интерферон- γ , ИЛ — интерлейкин, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

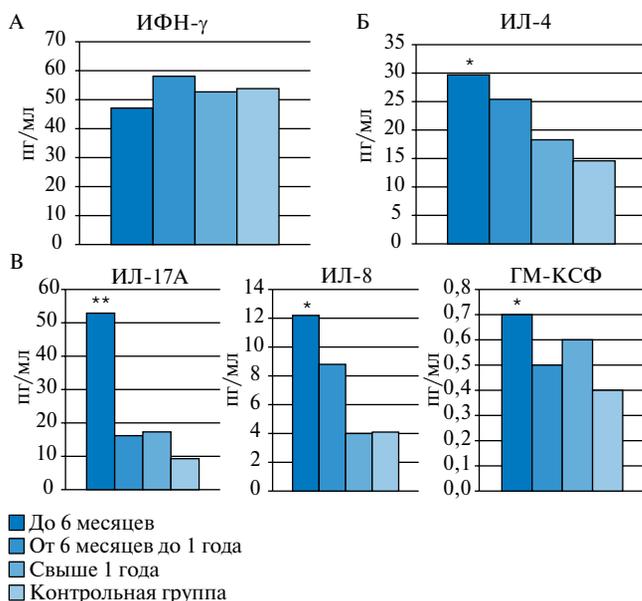


Рис. 9. Концентрации Th1- (А), Th2- (Б) и Th17-цитокинов (В) в сыворотке крови больных МК в зависимости от сроков заболевания.

Примечание: * — $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой.

Сокращения: ИФН- γ — интерферон- γ , ИЛ — интерлейкин, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

менее 6 месяцев, составив 29,7 пг/мл ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой). В последующем средние концентрации ИЛ-4 не отличались от показателя контрольной группы. В подгруппе с продол-

жительностью заболевания от 6 месяцев до 1 года содержание ИЛ-4 составило 25,4 пг/мл ($p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой), в подгруппе с продолжительностью заболевания свыше 1 года — 18,3 пг/мл ($p > 0,05$, по сравнению с контрольной группой).

Все исследованные цитокины, характеризующие Th17- субпопуляцию лимфоцитов, оказались повышенными в подгруппе пациентов с МК со сроками заболевания до 6 месяцев. Уровень ИЛ-17А составил 52,9 пг/мл ($p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой), средняя концентрация ИЛ-8 в сыворотке крови была равна 12,2 пг/мл ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой), и, наконец, содержание ГМ-КСФ составило 0,7 пг/мл ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой).

Концентрации ИЛ-17А, ИЛ-8 и ГМ-КСФ в крови больных МК со сроками заболевания от 6 месяцев до 1 года и свыше 1 года не отличались от соответствующих показателей контрольной группы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что Th17- и, возможно, Th2-субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов играют роль в возникновении и прогрессировании склеротических изменений в миокарде как исхода его острого воспалительного поражения.

Заключение

Особенности иммунного статуса больных ИИМ необходимо рассматривать в контексте баланса реакций противовирусной защиты и аутоиммунного повреждения сердечной мышцы. При ИИМ выявлено значительное снижение числа НКТ-лимфоцитов, обладающих противовирусной и цитотоксиче-

ской активностью. Т-лимфоциты больных ИИМ с минимальными проявлениями СН характеризовались признаками “ранней” активации, выявляемой по повышенной экспрессии маркера CD25. Напротив, в крови больных с выраженными симптомами СН было отмечено увеличение числа активированных не-Т-клеток, связанное, вероятно, со стимуляцией гуморальных иммунных реакций. Наконец, иммунный статус больных ИИМ характеризовался преобладанием лимфоцитов, несущих признаки “поздней” активации и готовности к реализации апоптотической программы, особенно в группе с выраженными симптомами СН. Последнее наблюдение указывает на вероятное нарушение механизмов активационного апоптоза лимфоцитов при ИИМ.

Для ИИМ характерна активация Th1-, Th2- и Th17-опосредованных механизмов иммунорегуляции. Рост концентрации Th1-цитокинов является наиболее ранним событием и связан, вероятно, с нарастанием симптомов СН. Активация Th2-субпопуляции лимфоцитов наблюдается в конце 1-го — во 2-м месяце заболевания и совпадает по времени с ростом числа активированных не-Т-лимфоцитов, реализуя, тем самым, гуморальные иммунопатологические процессы при миокардите.

Нарастание уровней Th17-цитокинов также происходит на фоне затухания Th1-опосредованных иммунных реакций, что, предположительно, связано с функциональным антагонизмом Th1- и Th17-субпопуляций лимфоцитов [13]. Th17-опосредованные иммунные процессы могут способствовать ремоделированию миокарда, прогрессированию склеротических изменений в сердечной мышце и трансформации миокардита в МК.

Литература

- Blauwet LA, Cooper LT. Myocarditis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010; 52(4): 274-88.
- Paleev NR, Paleev FN. Immunopathology of myocarditis. *Kreativnaya kardiologiya.* 2007; (1-2): 46-55. Russian (Палеев НР, Палеев ФН. Иммунопатология миокардитов. *Креативная кардиология.* 2007; (1-2): 46-55).
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62(16): e147-239.
- Schultheiss HP, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *Eur Heart J.* 2011; 32(21): 2616-25.
- Kindermann I, Barth C, Mahfoud F et al. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59(9): 779-92.
- Qian Q, Xiong S, Xu W. Manipulating intestinal immunity and microflora: an alternative solution to viral myocarditis? *Future Microbiol.* 2012; 7(10): 1207-16.
- Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J.* 2009; 30(16): 1995-2002.
- Salmasi ZhM, Sanina NP, Makarkov AI, et al. The role of Th17-mediated mechanisms of immune regulation in pathogenesis of inflammatory heart disease. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal.* 2012; 6(3): 211-22. Russian (Салмаси ЖМ, Санина НП, Макарьков АИ, и др. Роль Th17-опосредованных механизмов иммунорегуляции в патогенезе воспалительных поражений миокарда. *Российский иммунологический журнал.* 2012; 6(3): 211-22).
- Krueger GRF, Rojo J, Buja LM, et al. Human Herpes virus-6 (HHV-6) is a possible cardiac pathogen: an immune-histological and ultra-structural study. *Hosp Gen.* 2008; 71: 187-91.
- Nikitin Yu, Sukhina IA, Tsygan VN, et al. The immunologic characteristic of the stages of chronic hepatitis C and an assessment of immune system factors as prognostic criteria of a current disease. *Zhurnal infektologii.* 2009; (1): 30-40. Russian (Никитин ЮО, Сухина ИА, Цыган ВН, и др. Иммунологическая характеристика стадий хронического гепатита С и оценка факторов иммунной системы как прогностических критериев течения заболевания. *Журнал инфектологии.* 2009; (1): 30-40).
- Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, et al. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol.* 2013; 171(1): 8-19.
- Liu W, Huber SA. Cross-talk between CD1d-restricted NKT cells and $\gamma\delta$ cells in T regulatory cell response. *Viral J.* 2011; 8: 32.
- Paleev FN, Sanina NP, Makarkov AI. Immunopathology of inflammatory heart disease of viral etiology. *Almanac of clinical medicine* 2014; 35: 12-21. Russian (Палеев ФН, Санина НП, Макарьков АИ. Иммунологическая характеристика воспалительных заболеваний миокарда вирусной этиологии, *Альманах клинической медицины* 2014; 35: 12-21).
- Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, et al. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 2010; 106(10): 1646-55.
- Sanina NP, Paleev FN, Makarkov AI, et al. Cytokine profile of Th1-, Th2- and Th17-lymphocytes subpopulation in viral myocarditis. *Almanac of clinical medicine* 2014; 35: 22-29. Russian (Санина НП, Палеев ФН, Макарьков АИ и др. Цитокиновый профиль Th1-, Th2- и Th17-субпопуляций лимфоцитов при вирусных миокардитах. *Альманах клинической медицины* 2014; 35: 22-29).