

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ АТОРВАСТАТИНА И РОЗУВАСТАТИНА У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ НА ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА И НА АКТИВАЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ *IN VITRO*

Филатова А. Ю., Потехина А. В., Рулева Н. Ю., Радюхина Н. В., Арефьева Т. И.

Цель. Провести сравнительный анализ влияния “липофильного” аторвастатина и “гидрофильного” розувастатина на показатели клеточного иммунитета у пациентов с атеросклерозом.

Материал и методы. В исследование было включено 35 пациентов в возрасте 62 [57;68] лет, 18 мужчин и 17 женщин, направленных на обследование в ИКК им. А.Л. Мясникова с предварительным диагнозом ишемическая болезнь сердца, атеросклероз коронарных и сонных артерий, и имеющих показания к интенсификации терапии статинами. У 17 пациентов доза аторвастатина была увеличена с 20 мг до 80 мг, у 18 пациентов — доза розувастатина с 10 мг до 40 мг. Всем пациентам исходно и через один месяц методами прямой иммунофлуоресценции и проточной цитофлуориметрии проводилось определение содержания в периферической крови популяций лимфоцитов, включая регуляторные и эффекторные субпопуляции, и основных фракций моноцитов. В условиях клеточной культуры изучено влияние аторвастатина и розувастатина на пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов и липополисахарид-индуцированный синтез цитокинов моноцитами, выделенных из крови доноров.

Результаты. На фоне приема аторвастатина отмечено увеличение относительного содержания циркулирующих регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), увеличение соотношения Treg/Т-хелперы 17 (Th17) и уменьшение соотношения активированные CD4⁺Т-клетки/Treg. Терапия розувастатином не сопровождалась изменениями показателей клеточного иммунитета. Статины не влияли на субпопуляционный состав моноцитов крови. Обнаружено дозозависимое ингибирование статинами пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов; действие аторвастатина проявлялось при концентрации 10 нмоль/л, розувастатина — в 10 раз выше. Введение статинов, 10-100 нмоль/л, в культуру моноцитов не влияло ни на спонтанную, ни на индуцированную эндотоксином секрецию цитокинов.

Заключение. В терапевтических дозах аторвастатин обладает иммуномодулирующей активностью, проявляющейся в увеличении относительного содержания регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов крови, что может быть обусловлено подавлением пролиферации эффекторных клеток.

Российский кардиологический журнал. 2018;23(8):59–64
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-59-64>

Ключевые слова: атеросклероз, воспаление, статины, Т-лимфоциты, моноциты.

Конфликт интересов: работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00127.

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия.

Филатова А. Ю.* — лаборант-исследователь лаборатории клеточной иммунологии ИЭК, ORCID: 0000-0001-8911-1628, Потехина А. В. — к.м.н., м.н.с. отдела легочной гипертензии и заболеваний сердца ИКК, ORCID: 0000-0002-2459-1680, Рулева Н. Ю. — к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточной иммунологии ИЭК, ORCID: 0000-0002-2473-061X, Радюхина Н. В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточной иммунологии ИЭК, ORCID: 0000-0002-9005-7718, Арефьева Т. И. — д.б.н., г.н.с., и.о. руководителя лаборатории клеточной иммунологии ИЭК, ORCID: 0000-0002-9500-1940.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
anastasia.m088@yandex.ru

Th-act — активированные Т-хелперные лимфоциты, Treg — регуляторные Т-лимфоциты, Th — Т-хелперные клетки, IL-интерлейкин, MCP-1 — моноцитарный хемотаксический белок 1, TNF — фактор некроза опухоли, AC — атеросклероз, ОХС — общий холестерин, ХС ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности, ТГ — триглицериды.

Рукопись получена 20.06.2018

Рецензия получена 25.06.2018

Принята к публикации 04.06.2018

THE INFLUENCE OF ATORVASTATIN AND ROSUVASTATIN IN ATHEROSCLEROSIS ON THE PARAMETERS OF CELLULAR IMMUNITY AND *IN VITRO* LEUCOCYTE ACTIVATION

Filatova A. Yu., Potekhina A. V., Ruleva N. Yu., Radyukhina N. V., Arefieva T. I.

Aim. To compare the influence of “lipophilic” atorvastatin and “hydrophilic” rosuvastatin on the parameters of cellular immunity in atherosclerosis patients.

Material and methods. Totally, 35 participants included, mean age 62 [57;68] y.o., 18 males and 17 females, directed for follow-up to Myasnikov Cardiovascular Center with preliminary diagnosis coronary heart disease, atherosclerosis of coronary and carotid arteries, and with indications for intensified statin therapy. In 17 patients the dosage of atorvastatin was increased from 20 to 80 mg, in 18 — dosage of rosuvastatin from 10 to 40 mg. All patients at baseline and in 1 month, by the methods of direct immune fluorescence and cytofluometry underwent the measurement of content of monocytes and lymphocyte populations in peripheral blood, incl. regulatory and effector subpopulations of the latter. Under the circumstances of cellular culture the influence studied, of atorvastatin and rosuvastatin on CD4⁺ T-lymphocytes populations, as the lipopolysaccharide-induced synthesis of cytokines by monocytes of donors blood.

Results. At the background of atorvastatin, there was marked increase of relative content of circulating regulatory T-lymphocytes (Treg), increase of the relation of Treg/Thelper 17 (Th17) and changes of cellular immunity parameters. Statins did not influence subpopulations of blood monocytes. There was dose-dependent inhibition by statins of CD4⁺ T-lymphocytes proliferation: atorvastatin action was noted in 10 nM/L, rosuvastatin — in 10 times higher concentration. Introduction of

statins, 10-100 nM/L, to the culture of monocytes did not influence neither spontaneous, nor endotoxin induced secretion of cytokines.

Conclusion. In therapeutic dosages atorvastatin shows immune modulating activity presenting with an increase of relative content of regulatory T-lymphocytes subpopulations that might be determined by suppression of effector cells proliferation.

Russ J Cardiol. 2018;23(8):59–64

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-59-64>

Key words: atherosclerosis, inflammation, statins, T-lymphocytes, monocytes.

Conflicts of Interest: supported by Russian Foundation for Fundamental Research, № 17-04-00127.

National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia.

Filatova A. Yu. ORCID: 0000-0001-8911-1628, Potekhina A. V. ORCID: 0000-0002-2459-1680, Ruleva N. Yu. ORCID: 0000-0002-2473-061X, Radyukhina N. V. ORCID: 0000-0002-9005-7718, Arefieva T. I. ORCID: 0000-0002-9500-1940.

В патогенезе атеросклероза (АС) ведущую роль играет хроническое воспаление, развивающееся вследствие нарушения функции эндотелия и накопления атерогенных липопротеидов в стенке артерии. В регуляции воспалительного процесса при АС задействованы клетки врожденного (моноциты/макрофаги) и приобретенного (Т-лимфоциты) иммунитета, которые могут обладать как провоспалительной (проатерогенной), так и противовоспалительной, тормозящей развитие АС, активностью.

По данным ряда исследований, АС может быть ассоциирован с изменением в субпопуляционном составе циркулирующих моноцитов и лимфоцитов. Так, при хронических воспалительных заболеваниях было отмечено расширение CD16+ субпопуляций моноцитов (т.н. неклассических и промежуточных фракций) на фоне уменьшения относительного содержания классических CD16- моноцитов [1]. Среди Т-клеток отмечен относительный дефицит “противовоспалительных” популяций (Foxp3+ регуляторных Т-клеток (Treg), интерлейкин (IL)-10-продуцирующих Т-клеток) и смещение иммунного баланса в сторону эффекторных субпопуляций, в частности, продуцирующих IL-17 Т-хелперов (Th). Выявлена прогностическая значимость данных показателей в оценке риска быстрого прогрессирования АС как в сонных, так и коронарных артериях [2-3].

Статины нашли широкое применение в клинической практике и в настоящее время являются основной группой гиполипидемических препаратов, назначаемых пациентам с высоким риском АС коронарных и сонных артерий. Основной клеточной мишенью действия статинов являются гепатоциты; механизм действия заключается в конкурентном и дозозависимом ингибировании в клетках ключевого фермента биосинтеза холестерина 3-гидрокси-3-метил-глутарил-КоА редуктазы. Наряду с подавлением синтеза холестерина в клетках снижается образование промежуточных соединений, необходимых для посттрансляционной модификации ряда внутриклеточных белков, участвующих в передаче внутриклеточных сигналов, окислительно-восстановительных и других реакциях. В связи с этим, помимо основного гиполипидемического действия, статины обладают рядом дополнительных эффектов [4], среди которых следует выделить противовоспалительную и иммуномодулирующую активность. Эти свойства повышают эффективность статинов при лечении АС и являются обоснованием для назначения статинов пациентам с хроническими аутоиммунными заболеваниями в зарубежной практике [4-5]. Выраженность плейотропности эффекта статинов зависит от фармакокинетических показателей (особенностей их метаболизма в печени, показателей биодоступности), с одной стороны, и способности проникать в клетки различных типов, с другой. В связи с отсутствием

данных о наличии специфических переносчиков статинов в лейкоцитах, потенциал иммуотропного действия конкретного статина опосредован, по-видимому, его способностью проникать через цитоплазматическую мембрану, т.е. степенью липофильности препарата. Для подтверждения данной гипотезы в настоящем исследовании мы сравнили влияние двух наиболее широко применяемых в клинической практике препаратов: “липофильного” аторвастатина и “гидрофильного” розувастатина, — на показатели клеточного иммунитета у пациентов с АС сонных и/или коронарных артерий.

Материал и методы

Клиническое обследование: определение общеклинических и иммунологических показателей у пациентов, принимавших аторвастатин и розувастатин.

В исследование было включено 35 пациентов в возрасте 62 [57;68] лет, 18 мужчин и 17 женщин, направленных на обследование в ИКК им. А.Л. Мясникова с предварительным диагнозом ишемическая болезнь сердца, атеросклероз коронарных и сонных артерий, и имеющих показания к интенсификации терапии статинами. Пациенты были разделены на 2 группы. Группу “Аторвастатин” (n=18) составили пациенты, принимавшие ранее аторвастатин в дозе 20 мг/сут., которым назначали аторвастатин в дозе 80 мг/сут. В группу “Розувастатин” (n=17) были включены пациенты, принимавшие розувастатин в дозе 10 мг/сут., которым был назначен розувастатин в дозе 40 мг/сут. Сопутствующая терапия не изменялась в обеих группах пациентов во время проведения исследования.

В исследование не включали пациентов с инфарктом миокарда, острым нарушением мозгового кровообращения, хирургическими или эндоваскулярными вмешательствами в предшествующие 6 месяцев, злокачественными новообразованиями, тяжелой почечной или печеночной недостаточностью, с воспалительными/инфекционными заболеваниями, сахарным диабетом в стадии декомпенсации, а также пациентов, принимавших иммуотропные препараты.

Исследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБУ “НМИЦ кардиологии”. До включения в исследование у всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

Иммунофенотипирование лимфоцитов и моноцитов периферической крови проводили всем пациентам методом прямой иммунофлуоресценции с использованием флуоресцентно меченных антител к антигенам CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD(16+CD56), CD25, CD127, CD14, CD16, Foxp3, INF γ , IL17 и наборов для лизиса эритроцитов и фикс-

сации/пермеабиллизации клеток, в соответствии с инструкциями производителей (“Thermo Fisher Scientific”, “R&DSystems”, “BD Immunocytometry Systems”, США). Связывание антител оценивали методом проточной цитометрии на приборах FACS Calibur и FACS Canto (“BD Immunocytometry Systems”, США). Анализ внутриклеточных белков проводили во фракции мононуклеарных лейкоцитов, полученной путем центрифугирования образцов крови в градиенте плотности фиколл-верографин (1,077 г/см³). Перед окрашиванием внутриклеточных цитокинов мононуклеарные клетки были активированы в культуре в присутствии форболмиристацетата, иономицина и брэфельдина А (“Sigma-Aldrich”, США). Лимфоциты выделяли по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Определяли количество Т-клеток CD3+, включая популяции CD4+хелперных и CD8+цитотоксических лимфоцитов, В-клеток (CD19+), NK (CD3-CD (16+56)+). Активированные Т-хелперные клетки (Th-act) типировали как CD4+CD25lowCD127high; Treg — как CD4+CD25highCD127low и CD4+Foxp3+клетки. Th1 и Th17 типировали как CD4+INFγ+ и CD4+IL17+ лимфоциты, соответственно. Субпопуляции моноцитов крови типировали как классические (CD14++CD16–), промежуточные (CD14++CD16+) и неклассические (CD14+CD16+).

Измерение концентрации моноцитарного хемотаксического белка — 1 (MCP-1) в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора производства “Thermo Fisher Scientific” (США).

Все измерения проводили перед включением в исследование и через один месяц после увеличения дозы статинов.

Исследование влияния аторвастатина и розувастатина на пролиферацию лимфоцитов здоровых доноров *in vitro*. CD4+-клетки были выделены из фракции мононуклеарных клеток крови методом иммуномагнитной сепарации с помощью набора CD4 T Cell Isolation Kit II (“Miltenyi Biotec”, Германия). Выделенные клетки инкубировали 10 мин в среде RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 5 мкМ витального флуоресцентного красителя CFSE (“Thermo Fisher Scientific”, США) при 37° С. Затем клетки отмывали, высевали в 24-луночный планшет и культивировали в течение 24 часов в присутствии аторвастатина или розувастатина (10-1000 нмоль/л) в среде EX VIVO 15 (“Lonza”, Швейцария) с добавлением 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин, раствора незаменимых аминокислот (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для стимуляции пролиферации в лунки добавляли 10 мкг/мл фитогемагглютинина (“Sigma-Aldrich”, США) и 5 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-2 (“R&DSystems”, США). Через 72 часа оценивали флуоресценцию

CFSE на проточном цитофлуориметре. Для определения относительного содержания Treg в культуре лимфоцитов клетки окрашивали антителами к Foxp3, как указано выше.

Исследование влияния аторвастатина и розувастатина на индуцированный липополисахаридом синтез цитокинов моноцитами крови здоровых доноров. Мононуклеарные клетки крови выделяли из крови как указано выше и высаживали в 24-луночный планшет в среде RPMI 1640 (“Биолот”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, по 50 Ед/мл пенициллина и стрептомицина (“Thermo Fisher Scientific”, США) в концентрации 3 млн/мл. Культивирование клеток проводили при 37° С в атмосфере 5% CO₂. Через час удаляли неприкрепленные клетки. Адгезировавшие клетки культивировали в течение 24 часов в среде RPMI 1640 — 10% эмбриональной телячьей сыворотки; аторвастатин и розувастатин вносили в культуру в концентрации 10-100 нмоль/л. Затем добавляли липополисахарид (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 100 нг/мл. Через 24 часа отбирали среду культивирования клеток. Концентрацию фактора некроза опухоли (TNF), IL-1β, IL-6 определяли с помощью набора BD Human Inflammatory Cytokine CBA Kit (“BD Biosciences”, США) на цитометре FACS Calibur. Уровень MCP-1 определяли методом иммуноферментного анализа, как указано выше.

Статистический анализ данных. Данные представлены как медиана [25-й процентиль; 75-й процентиль]. Для парных межгрупповых сравнений использовали критерий U Манна-Уитни. Для парных внутригрупповых сравнений использовали W-критерий Уилкоксона. Для сопоставления групп по качественным признакам использовали двусторонний критерий Фишера. В работе применяли пакет статистических программ Statistica 8,0. Различия считались статистически достоверными при p<0,05.

Результаты

По исходным клиническим характеристикам (возраст, индекс массы тела, статус курения, анамнез артериальной гипертензии, анамнез перенесенного инфаркта миокарда) включенные в исследование пациенты групп “Аторвастатин” и “Розувастатин” не различались.

Клинико-лабораторные и иммунологические показатели пациентов, принимавших аторвастатин и розувастатин, исходно и на фоне терапии, приведены в таблице 1.

На фоне терапии в группах “Аторвастатин” и “Розувастатин” отмечалось статистически значимое и обусловленное основным гиполлипидемическим свойством статинов снижение уровня общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП); в группе “Аторвастатин” отмечалось

Таблица 1

Клинико-лабораторные и иммунологические показатели пациентов, принимавших аторвастатин и розувастатин

Показатель	Группа "Аторвастатин" (n=18)		Группа "Розувастатин" (n=17)	
	Исходно	Через 1 мес.	Исходно	Через 1 мес.
Лейкоциты, млн/мл	6,9 [5,3;8,0]	7,5 [5,0;8,0]	6,4 [5,2;7,0]	6,2 [5,0;6,8]
Глюкоза, ммоль/л	5,6 [5,3;5,6]	5,6 [5,0;5,8]	5,5 [4,9;6,4]	5,3 [5,2;6,2]
ОХС, ммоль/л	5,3 [3,9;6,2]	3,9 [3,4;4,6]*	4,5 [4,0;6,9]	3,9 [3,2;4,8]*
ХС ЛВП, ммоль/л	1,0 [0,9;1,3]	1,0 [0,9;1,3]	1,1 [0,9;1,3]	1,1 [1,0;1,4]
ХС ЛНП, ммоль/л	3,7 [2,1;4,4]	2,4 [1,8;3,1]*	3,2 [2,4;4,8]	2,0 [1,7;2,6]*
Триглицериды, ммоль/л	1,2 [0,9;1,9]	0,9 [0,7;1,3]*	1,2 [0,9;1,7]	0,9 [0,7;1,4]
Лимфоциты, %	26,0 [23,0;33,0]	25,0 [22,5;28,0]	32,0 [28,0;35,0]	29,0 [26,0;35,0]
Моноциты, %	6,0 [5,0;8,0]	7,0 [5,0;8,0]	7,0 [6,0;9,0]	7,0 [6,0;8,0]
Т-лимфоциты (% от лимфоцитов)	71,0 [68,0;73,0]	69,0 [66,0;73,0]	71,0 [63,0;76,0]	70,5 [65,0;75,5]
CD3+CD4+ Т-лимфоциты (% от лимфоцитов)	46,0 [43,0;48,0]	45,5 [40,0;48,0]	43,0 [35,5;45,0]	40,5 [33,0;50,0]
Th-act (% от CD4+ клеток)	54,6 [47,7;58,0]	55,1 [43,9;58,6]	53,1 [45,9;56,2]	55,0 [46,5;58,0]
CD25highCD127low Treg (% от CD4+ клеток)	5,4 [4,6;6,5]	6,5 [4,8;8,2]*	5,8 [4,7;6,5]	4,8 [4,1;5,9]
Foxp3+ Treg (% от CD4+ клеток)	9,9 [7,3;10,3]	9,4 [7,5;11,8]	6,9 [6,0;8,6]	8,0 [6,4;8,7]
Th1 (% от CD4+ клеток)	20,8 [14,0;28,6]	18,4 [14,0;26,5]	21,3 [18,5;26,6]	20,3 [14,8;26,9]
Th17 (% от CD4+ клеток)	1,7 [0,9;3,1]	1,4 [0,9;2,0]	1,3 [0,8;1,9]	1,5 [1,1;2,1]
Th-act/ CD25highCD127low Treg	9,6 [7,2;12,5]	8,7 [6,1;10,7]*	9,1 [8,2;10,4]	10,4 [8,7;11,7]
CD25highCD127low Treg/Th17	3,2 [1,5;6,3]	4,8 [2,3;6,7]	3,8 [2,5;7,9]	3,6 [2,3;4,8]
Foxp3+ Treg/Th17	4,4 [2,8;8,8]	6,8 [4,4;11,5]*	5,1 [3,4;8,6]	6,2 [3,7;8,3]
CD3+CD8+ (% от лимфоцитов)	23,0 [18,5;30,5]	22,5 [20,0;26,0]	27,0 [23,0;30,0]	27,0 [24,5;30,0]
В-клетки (% от лимфоцитов)	10,0 [8,0;12,0]	9,0 [7,0;12,0]	8,0 [6,6;11,0]	8,0 [5,5;11,0]
НК-клетки (% от лимфоцитов)	19,0 [17,8;23,0]	19,8 [17,0;24,5]	20,6 [14,5;28,0]	21,0 [16,0;24,3]
Неклассические моноциты (тыс./мл)	9,7 [7,6;12,0]	11,7 [7,2;13,0]	10,5 [7,6;12,6]	9,8 [8,5;12,8]
Промежуточные моноциты (тыс./мл)	6,3 [3,4;8,2]	6,2 [4,1;8,0]	6,1 [4,2;10,4]	4,8 [3,8;7,6]
Классические моноциты (тыс./мл)	48,7 [38,7;62,6]	51,8 [42,7;57,3]	49,7 [36,5;53,3]	49,9 [38,1;54,8]
MCP-1, пг/мл	120,0 [100,0;150,0]	111,0 [95,0;135,0]	105,0 [75,0;130,0]	100,0 [82,0;112,0]

Примечания: данные представлены как медиана и интерквартильный размах. * — p<0,05.

характерное преимущественно для аторвастатина снижение концентрации триглицеридов (ТГ).

На фоне интенсификации терапии аторвастатином отмечалось увеличение относительного содержания в крови популяции CD4+CD25highCD127low Treg, увеличение соотношения CD4+Foxp3+Treg/Th17 и уменьшение соотношения Th-act/Treg. В группе "Розувастатин" подобных изменений не наблюдалось. По содержанию других субпопуляций CD4+ лимфоцитов, В-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток, субпопуляций моноцитов различий на фоне терапии в обеих группах больных не выявлено. Мы также не обнаружили значимых различий в концентрации MCP-1 в крови на фоне приема аторвастатина и розувастатина.

При изучении влияния статинов на активацию лимфоцитов и моноцитов в культуре нами обнаружено дозозависимое ингибирование пролиферации CD4+лимфоцитов, преимущественно Foxp3-негативных эффекторных клеток. Результаты одного из трех независимых экспериментов приведены на рисунке 1. Следует отметить, что действие аторвастатина проявлялось при более низких концентра-

циях, от 10 нмоль/л, в то время как антипролиферативное влияние розувастатина отмечалось при концентрации 100 нмоль/л. При концентрации 1 мкмоль/л оба статина блокировали пролиферацию лимфоцитов практически полностью.

Содержание цитокинов (TNF, IL-1β, IL-6, MCP-1) в супернатанте культуры моноцитов существенно увеличивалось при добавлении липополисахарида. Дополнительное введение аторвастатина и розувастатина в концентрациях 10-100 нмоль/л, сопоставимых с их содержанием в крови пациентов, не влияло ни на спонтанную, ни на индуцированную эндотоксином секрецию указанных цитокинов (данные не приведены).

Обсуждение

Несмотря на то, что плейотропный эффект статинов широко обсуждается в современной литературе, данных клинических исследований, посвященных этой теме, явно недостаточно. Так, современные представления об иммунотропной активности статинов основаны преимущественно на результатах экспериментальных исследований, выполненных на

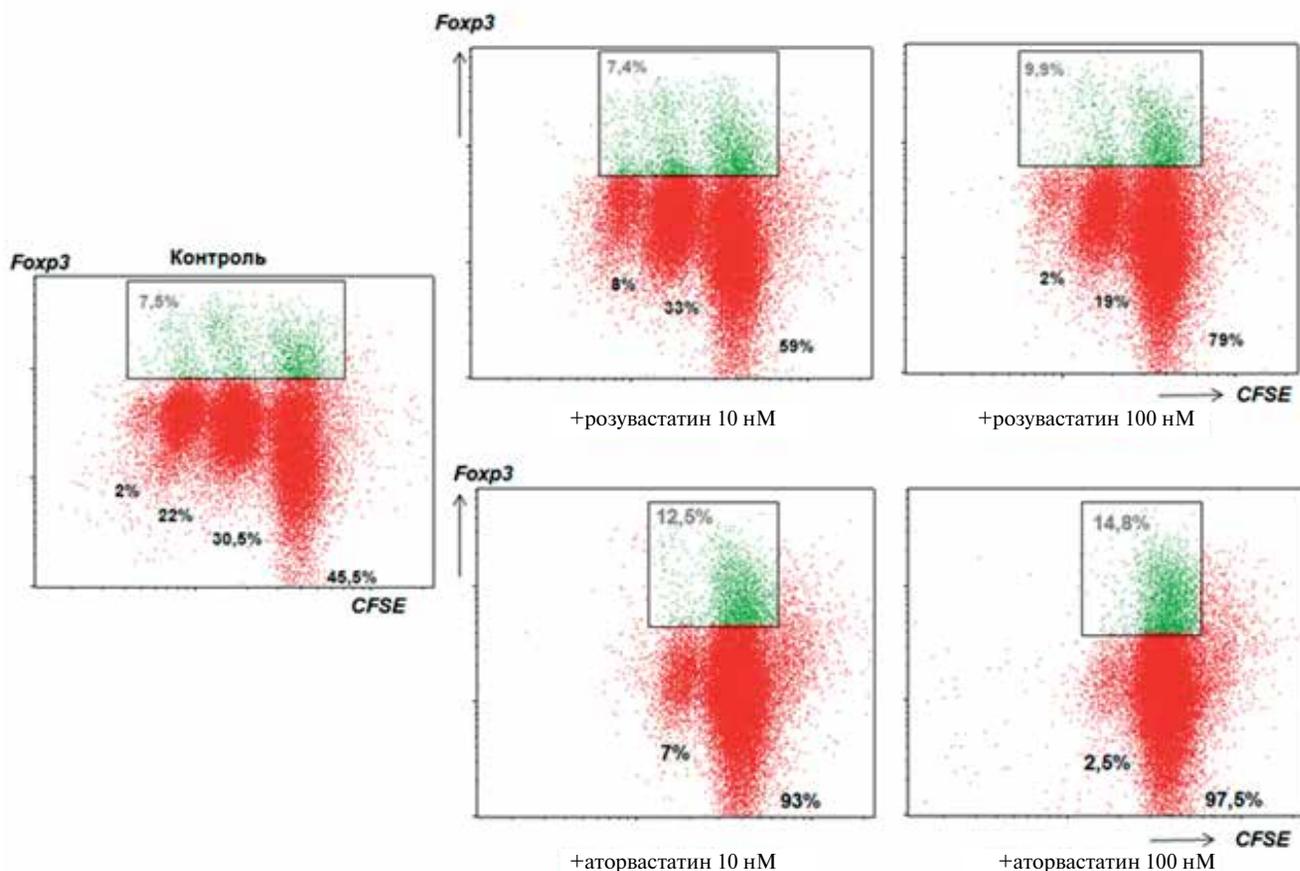


Рис. 1. Влияние статинов на пролиферацию CD4+ Т-клеток. В качестве контроля взяты клетки, активированные фитогемагглютинином и IL-2 (см. раздел Материалы и методы). Красным шрифтом указано относительное количество CD4+лимфоцитов, прошедших 0-4 цикла деления; зелёным шрифтом — относительное содержание CD4+Foxp3+клеток в культуре.

грызунах и в культуре клеток, при этом в большинстве работ статины использовались в микромолярных концентрациях, что существенно превышает содержание препаратов в крови пациентов. Влияние статинов на субпопуляционный состав лимфоцитов и моноцитов крови человека изучалось в единичных работах. Показано, что прием симвастатина или правастатина пациентами с гиперхолестеринемией в течение 8 нед. [6] и аторвастатина пациентами с ревматоидным артритом в течение 12 нед. [7] сопровождался увеличением относительного содержания в крови Treg. Прием статинов в течение короткого (2 нед.) периода у пациентов с острым коронарным синдромом также был ассоциирован с увеличением содержания циркулирующих Treg [8]. Ранее нами также было показано, что у пациентов с ишемической болезнью сердца, принимавших аторвастатин, относительное количество Treg в крови было выше, чем у лиц, не принимавших статины, а увеличение дозы аторвастатина с 20 до 80 мг/сут. в течение 7 дней приводило к дальнейшему увеличению относительного содержания Treg [9-10].

Сравнительный анализ действия статинов на лимфоциты в культуре показал более высокую

активность “липофильных” агентов. Kurakata, et al. [11] сравнили антипролиферативные эффекты “гидрофобного” симвастатина и “гидрофильного” правастатина при разных способах активации лимфоцитов (в присутствии фитогемагглютинаина, IL-2 и в смешанной культуре лимфоцитов). Оказалось, что во всех случаях первый был более эффективен (IC50 ~0,013 против 5,6 мкМ, соответственно). Добавление в культуру мононуклеарных клеток крови человека аторвастатина, но не мевастатина и правастатина, способствовало увеличению относительного количества CD4+Foxp3+ Treg [6]; инкубация мононуклеарных клеток крови пациентов с острым коронарным синдромом в присутствии симвастатина также приводила к увеличению содержания в культуре Treg и усилению их иммуносупрессорных свойств [12].

В настоящем исследовании мы сравнили влияние “липофильного” аторвастатина и “гидрофильного” розувастатина на клетки иммунной системы. На фоне терапии аторвастатином, но не розувастатином, мы наблюдали незначительное, но достоверное увеличение относительного содержания циркулирующих Treg, увеличение соотношения CD4+Foxp3+Treg/

Th17 и снижение соотношения Th-act/Th17. В культуре CD4+ Т-лимфоцитов в присутствии статинов нами отмечено уменьшение количества пролиферирующих клеток, сопровождающееся увеличением относительного содержания Foxp3+ Treg, причем эффект аторвастатина наблюдался при более низких, “физиологических”, концентрациях препарата. Мы полагаем, что наблюдаемое у пациентов, принимающих аторвастатин, перераспределение субпопуляций Т-клеток является следствием ингибирования пролиферации эффекторного звена.

Имеются единичные исследования о влиянии статинов на субпопуляционный состав моноцитов, и их результаты неоднозначны. Согласно одним исследованиям [13], статины уменьшают количество циркулирующих неклассических моноцитов, согласно другим [14], статины не оказывают существенного влияния на субпопуляции моноцитов. В ряде работ описано ингибирование статинами синтеза провоспалительных цитокинов моноцитами. Так, добавление симвастатина в культуру стимулированных интерфероном- γ макрофагов человека способствовало снижению концентрации MCP-1 в супернатанте и уменьшению содержания в клетках мРНК MCP-1 [15], а добавление аторвастатина и симвастатина в культуру моноцитов, выделенных из периферической крови доноров, ингибировало индуцированную С-реактивным белком секрецию MCP-1 [16]. Однако описаны и противоположные результаты. Внесение в культуру моноцитарных клеток “липофильных”

симвастатина, аторвастатина и ловастатина, но не “гидрофильного” правастатина, способствовало стимуляции продукции моноцитами IL-1 β , TNF, MCP-1 и IL-8 и увеличению концентрации этих цитокинов [17]. Вероятно, такие противоречивые данные обусловлены различиями в условиях культивирования клеток и в использованных дозах препаратов. В настоящем исследовании мы не обнаружили достоверного влияния ни аторвастатина, ни розувастатина на субпопуляционный состав моноцитов, на концентрацию MCP-1 у пациентов на фоне увеличения дозы препаратов. Добавление статинов в культуру моноцитов не влияло на синтез цитокинов. Следует отметить, что в нашей работе статины использовались в низких, соответствующих терапевтическим, дозах, а клетки культивировали в присутствии сыворотки — источника липопротеидов. Возможно, эти два фактора объясняют отсутствие наблюдаемого в других исследованиях эффекта статинов.

Подводя итог, можно сделать следующее заключение. В терапевтических дозах аторвастатин обладает иммунорегуляторной активностью, что проявляется, прежде всего, в повышении соотношения Treg/Th17. Это может оказывать дополнительное положительное влияние у пациентов с Th17-ассоциированными аутоиммунными состояниями и провоспалительным статусом, связанным с недостаточностью Treg.

Конфликт интересов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00127.

Литература

- Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, et al. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *The Journal of Immunology*. 2011;186:1809-15. doi:10.4049/jimmunol.1001866.
- Potekhina A, Pylaeva EA, Provatorov S, et al. Treg/Th17 balance in stable CAD patients with different stages of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;238:17-21. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.088.
- Filatova AY, Pylaeva EA, Potekhina AV, et al. Subpopulation composition of CD4+ T-lymphocytes as factor contributing to the progression of atherosclerosis of carotid arteries. *Kardiologiya*. 2017;57:64-71. (In Russ.) Филатова А.Ю., Пылаева Е.А., Потехина А.В. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов CD4+ как фактор, способствующий прогрессированию атеросклероза сонных артерий. *Кардиология*. 2017;57(4):64-71. doi: 10.18565/cardio.2017.4.64-71.
- Bedi O, Dhawan V, Sharma PL, et al. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2016;389:695-712. doi:10.1007/s00210-016-1252-4.
- Arefieva TI, Filatova AY, Potekhina AV, et al. Mechanisms of immunotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins). *Biochemistry*. 2018;8:1111-29 [In print]. (In Russ.) Арефьева Т.И., Филатова А.Ю., Потехина А.В. и др. Иммунотропные эффекты и предполагаемые механизмы действия ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (статинов). *Биохимия*. 2018;8:1111-29; в печати.
- Mausner-Fainberg K, Luboshits G, Mor A, et al. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4+CD25+ T cells. *Atherosclerosis*. 2008;197:829-39.
- Tang TT, Song Y, Ding YJ, et al. Atorvastatin upregulates regulatory T cells and reduces clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Lipid Research*. 2011;52:1023-32. doi:10.1194/jlr.M010876.
- Zhang D, Wang S, Guan Y, et al. Effect of oral atorvastatin on CD4+CD25+ regulatory T cells, FoxP3 expression, and prognosis in patients with ST-segment elevated myocardial infarction before primary percutaneous coronary intervention. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2011;57:536-41. doi:10.1097/FJC.0b013e318211d016.
- Pylaeva EA, Potekhina AV, Pogorelova OA, et al. Opposite changes of regulatory T cell blood content may differentially contribute to atherosclerosis or lymphoproliferative disorders. *OncoReview*. 2016;6:A29-36.
- Kuznetsova GV, Potekhina AV, Arefieva TI, et al. The effects of atorvastatin on blood T-cell frequencies in patients with stable angina. *The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias*. 2016;4:30-9. (In Russ.) Кузнецова Г.В., Потехина А.В., Арефьева Т.И. и др. Влияние аторвастатина на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у пациентов со стабильной стенокардией напряжения. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2016;4:30-9.
- Kurakata S, Kada M, Shimada Y, et al. Effects of different inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) reductase, pravastatin sodium and simvastatin, on sterol synthesis and immunological functions in human lymphocytes in vitro. *Immunopharmacology*. 1996;34:51-61.
- Meng X, Zhang K, Li J, et al. Statins induce the accumulation of regulatory T cells in atherosclerotic plaque. *Mol Med*. 2012;18:598-605. doi:10.2119/molmed.2011.00471.
- Coen PM, Flynn MG, Markofski MM, et al. Adding exercise to rosuvastatin treatment: influence on C-reactive protein, monocyte toll-like receptor 4 expression, and inflammatory monocyte (CD14+CD16+) population. *Metabolism*. 2010;59:1775-83. doi:10.1016/j.metabol.2010.05.002.
- Jaipersad AS, Shantsila E, Blann A, et al. The effect of statin therapy withdrawal on monocyte subsets. *European Journal of Clinical Investigation*. 2013;12:1307-13. doi:10.1111/eci.12183.
- Veillard NR, Brauwersreuther V, Arnaud C, et al. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis*. 2006;1:51-8.
- Montecucco F, Burger F, Pelli G, et al. Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 upregulation and chemotaxis in adherent human monocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;3:233-42. doi:10.1093/rheumatology/ken466.
- Keiner PA, Davis PM, Murray JL, et al. Stimulation of inflammatory responses in vitro in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *International Immunopharmacology*. 2001;1:105-18.