

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *FOXP3*, *IL2R*, *CD8A*, *RORγ* В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Топчиева Л.В.¹, Корнева В.А.², Малышева И.Е.¹

¹ Институт биологии – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр Российской академии наук”», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

² ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Резюме. Нарушение баланса Т-регуляторных и Т-эффекторных лимфоцитов рассматривается в последнее время как важное патогенетическое звено артериальной гипертензии (АГ). Однако данные литературы относительно количества этих клеток у пациентов с АГ или у экспериментальных животных с разными моделями индуцированной гипертензии противоречивые. Основные сведения об изменении паттерна иммунных клеток при сердечно-сосудистых заболеваниях получены с использованием проточной цитометрии. В литературе встречаются также данные об экспрессии у больных с патологиями сердечно-сосудистой системы генов, кодирующих поверхностные и цитоплазматические дифференцировочные антигены иммунных клеток, которые совпадают с результатами исследований, полученных с помощью проточной цитометрии. Цель исследования: анализ уровня транскриптов генов, кодирующих маркеры дифференцировки регуляторных (*FOXP3*, *IL2R*) и эффекторных Т-лимфоцитов (Т-хелперов 17 (*RORγ*) и CD8 лимфоцитов (*CD8A*) у здоровых людей и пациентов с артериальной гипертензией (I–II стадии). Обследованы здоровые индивиды (40 человек, 20 мужчин и 20 женщин), пациенты с АГ, не принимавшие гипотензивные препараты (27 человек, 14 мужчин и 13 женщин), пациенты с АГ, принимающие блокаторы β-адренорецепторов (метопролол или бисопролол) (26 человек, 12 мужчин и 14 женщин). Относительный уровень транскриптов в лейкоцитах периферической крови оценивали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Показано, что транскрипционная активность *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ* и *CD8A* генов в лейкоцитах периферической крови больных людей существенно выше, чем у здоровых индивидов ($p < 0,01$). Это, вероятно, свидетельствует о повышении у гипертоников количества циркулирующих Т-регуляторных лимфоцитов, CD8⁺ клеток и Т-хелперов 17 и активации у них Т-клеточного иммунитета. Статистически значимых различий в содержании мРНК генов *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ* и *CD8A* в лейкоцитах периферической крови мужчин и женщин, как в группе здоровых людей, так и группе пациентов с АГ не выявлено. На фоне приема кардиоселективных блокаторов β-адренорецепторов (метопролола и бисопролола) у гипер-

Адрес для переписки:

Топчиева Людмила Владимировна
Институт биологии – обособленное подразделение
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
“Карельский научный центр Российской академии наук”»
185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск,
ул. Пушкинская, 11.
Тел./факс: 8 (814) 76-98-10.
E-mail: topchieva67@mail.ru

Address for correspondence:

Topchieva Ludmila V.
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences
185910, Russian Federation, Republic of Karelia,
Pushkinskaya str., 11.
Phone/fax: 7 (814) 76-98-10.
E-mail: topchieva67@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, И.Е. Малышева
«Уровень экспрессии генов *FOXP3*, *IL2R*, *CD8A*,
RORγ в лейкоцитах периферической крови здоровых
людей и пациентов с артериальной гипертензией» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2.
С. 273–282. doi: 10.15789/1563-0625-FIC-2385
© Топчиева Л.В. и соавт., 2022

For citation:

L.V. Topchieva, V.A. Korneva, I.E. Malysheva “*FOXP3*,
IL2R, *CD8A* and *RORγ* gene expression in peripheral blood
leukocytes of healthy people and patients with arterial
hypertension”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 273–282.
doi: 10.15789/1563-0625-FIC-2385
DOI: 10.15789/1563-0625-FIC-2385

тоникиков наблюдался более низкий уровень экспрессии указанных генов, что, вероятно, указывает на противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства этих препаратов.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, адаптивный иммунитет, T-регуляторные лимфоциты, T-эффекторные лимфоциты, экспрессия генов, кардиоселективные блокаторы β-адренорецепторов

FOXP3, IL2R, CD8A AND RORγ GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES OF HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

Topchieva L.V.^a, Korneva V.A.^b, Malysheva I.E.^a

^a *Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation*

^b *Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation*

Abstract. Impaired balance of T regulatory and T effector lymphocytes has recently been considered as an important pathogenetic link in arterial hypertension (AH). There are, however, contradictory literature data about contents of these cells in the patients with hypertension, or obtained in experimental animal models of induced hypertension. Most results about changed patterns of immune cells in cardiovascular diseases were obtained by means of flow cytometry. There are also some works on expression of genes encoding surface and cytoplasmic differentiation antigens of immune cells in the patients with cardiovascular pathologies. These results coincide with the data obtained with flow cytometric techniques. Purpose of the present study was to analyze of the levels of gene transcripts encoding differentiation markers of regulatory (*FOXP3*, *IL2R*) T cells, effector T subpopulations (T helpers 17 (*RORγ*), and CD8 lymphocytes (*CD8A*) in healthy subjects and the patients with arterial hypertension (stages I-II). We examined healthy individuals (40 people, 20 men and 20 women), 27 patients with hypertension who did not receive antihypertensive therapy (14 men and 13 women), 26 hypertensive patients taking β-adrenergic receptor blockers (metoprolol or bisoprolol), including 12 men and 14 women. The relative levels of transcripts in peripheral blood leukocytes were assessed by real-time RT-PCR. It was shown that the transcriptional activity of *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ*, and *CD8A* genes in peripheral blood leukocytes of the diseased people was significantly higher than in healthy individuals ($p < 0.01$). This finding may indicate an increased number of circulating T regulatory lymphocytes, CD8⁺ cells and T helpers 17 in hypertensive patients, and activation of T cell immunity in these patients. There were no statistically significant gender differences in *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ* and *CD8A* gene expression in leukocytes, both in the group of healthy people and in hypertensive patients. The patients receiving cardioselective β-adrenergic receptor blockers (metoprolol and bisoprolol) exhibited lower expression of these genes, thus, probably, indicating anti-inflammatory and immunomodulatory properties of these drugs.

Keywords: arterial hypertension, adaptive immunity, T regulatory lymphocytes, T effector lymphocytes, gene expression, β-adrenergic receptor blockers, cardioselective

Введение

В патогенезе артериальной гипертензии (АГ) существенную роль играет воспаление, реализуемое через активацию клеток врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета [7, 28]. Важные компоненты последнего – многочисленные типы Т-клеток, которые на основании профиля продукции цитокинов и экспрессии специфических факторов транскрипции

классифицируются на четыре основных подгруппы: Th1, Th2, Th17 и регуляторные Т-клетки (Treg) [38]. Выдвигается предположение, что дисрегуляция иммунного ответа является одним из ключевых факторов формирования АГ [31, 34]. У пациентов с АГ наблюдается увеличение пула провоспалительных Т-хелперов (Th1) и снижение количества противовоспалительных Th2 [17]. В развитии иммунного ответа играют

роль не только эффекторные, но и регуляторные Т-лимфоциты (Treg), или иначе, Т-супрессоры, контролирующая численность и активность Т-хелперов и Т-киллеров [2]. Молекулярным маркером этих клеток считается экспрессия гена транскрипционного фактора FoxP3 (Forkhead Box P3). Данные, полученные в экспериментах на животных с различными моделями гипертензии, и результаты исследований пациентов с патологиями сердечно-сосудистой системы, свидетельствуют о том, что при этих заболеваниях нарушается баланс CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных клеток и общего числа Т-лимфоцитов, что может негативно сказываться на супрессии иммунного ответа [28]. В развитии гипертензии существенную роль играют Т-хелперы 17 (Th17), подтип CD4⁺Т-клеток, характеризующийся продуцированием провоспалительного цитокина интерлейкина-17 [14]. Снижение соотношения Т-регуляторных лимфоцитов и Th17 характерно для пациентов с АГ [17], острым коронарным синдромом [25], атеросклеротическим повреждением сосудов [26]. В развитии воспаления при формировании стабильно высокого давления крови, вероятно, играют роль и другие Т-клетки. Так, АГ сопровождается повышением процента цитотоксических CD8⁺Т-клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины IFN γ и TNF α [28]. Тем не менее, вопрос, как изменяется пул Treg-, Th17- и CD8⁺ клеток при АГ, остается открытым. Например, в работе Ji и соавт. показано, что у лиц с повышенным давлением крови увеличено количество Th17 [17]. В то же время в другом исследовании значимых различий в количестве этих клеток у пациентов с артериальной гипертензией и нормотоников не обнаружено [11]. Данные о количестве Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с артериальной гипертензией и экспрессии у них и экспериментальных животных гена *FOXP3* также неоднозначны. В одних случаях при гипертензии отмечено снижение количества Treg-клеток [17, 18], в других – отсутствие значимых различий этого показателя у здоровых людей и гипертоников [3, 11]. Известно, что некоторые препараты, используемые для лечения кардиоваскулярных расстройств, обладают противовоспалительными свойствами. Например, применение статинов способствует не только нормализации липидного спектра больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, но и снижению активности NLRP3 инфламмосомы и продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [23]. Эти лекарственные средства, а также гипотензивные препараты (например кардиосе-

лективные блокаторы β -адренорецепторов) способствуют повышению пула Treg-клеток [26] и снижению содержания IL-17 в плазме крови [17]. Тем не менее, данные о влиянии гипотензивной терапии на баланс Treg-клеток, Th17 и CD8⁺Т-клеток при АГ еще малочисленны. Важнейшей характеристикой Treg-клеток является экспрессия гена *FOXP3* и альфа субъединицы рецептора к цитокину IL-2 (CD25), а Th17 – гена транскрипционного фактора *ROR γ* (RETINOIC ACID-RELATED ORPHAN RECEPTOR GAMMA). Маркером дифференцировки цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов является присутствие на поверхности этих клеток гликопротеина, облегчающего распознавание клеточно-связанных антигенов основного комплекса гистосовместимости класса I. *CD8A*-ген кодирует альфа-цепь этого белка.

Цель исследования – анализ уровня экспрессии генов *FOXP3*, *ROR γ* , *CD8A*, *IL2R* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) здоровых доноров и пациентов с артериальной гипертензией (I-II стадии).

Материалы и методы

В исследование включены 40 здоровых индивидов (возраст 45 \pm 4,3 лет), 27 пациентов с АГ, не принимавшие гипотензивные препараты (возраст 42 \pm 5,2 года), 26 пациентов с АГ, принимающие блокаторы β -адренорецепторов (метопролол (25 мг/сут) или бисопролол (5-10 мг/сут) (возраст 50 \pm 3,8 лет). Средний возраст обследованных лиц во всех группах значимо не различался ($p > 0,05$). Поскольку препараты, способствующие снижению артериального давления различаются по механизму действия, в группу пациентов, находящихся на терапии были включены лица принимающие только блокаторы β -адренорецепторов. Продолжительность приема препаратов – более 1 года. Подгруппа здоровых обследована при прохождении диспансеризации на базе ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи г. Петрозаводска». Диагноз «АГ» установлен с учетом европейских рекомендаций по АГ 2018 г. [39].

Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, курение табака, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥ 28 кг/м². Индекс массы тела составил в среднем 25,28 \pm 0,53. Все доноры являлись жителями Республики Карелия. На проведение исследований получено согласие Комитета по медицинской этике Минздрава Республики Карелия и ПетрГУ.

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

TABLE 1. REAL-TIME PCR PRIMER SEQUENCE

Ген Gene	Последовательность праймера 5'....3' Primer sequence 5'....3'		Размер ПЦР продукта, п.о. PCR product size, bp	Источник Source
	Прямой Forward	Обратный Reverse		
<i>FOXP3</i>	GCCACAACCTGAGTCTGC	GTTCTGTCATCCTCCTTTCC	172	[15]
<i>CD8A</i>	CACCTTCCTCCTATACCTCTC	GTAGCCCTCGTTCTCTCG	136	Собственный дизайн Own design
<i>IL2RA</i>	CAACTCCTGACTCCGATAG	TGAATCCATCTTCCTGACC	184	Собственный дизайн Own design
<i>RORγ</i>	CCAAGGCAGGGCTCAATG	GAAGTCCACATCGGTCAGG	123	[15]
<i>18S rRNA</i>	AGAAACGGCTACCACATCCA	CACCAGACTTGCCTCCA	169	[30]
<i>GAPDH</i>	GACAGTCAGCCGCATCTTC	ACTCCGACCTTCACCTTCC	79	Собственный дизайн Own design

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* В ЛПК ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АГ

TABLE 2. RELATIVE LEVEL OF *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* GENES TRANSCRIPTS IN PBL OF HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH HYPERTENSION

Ген Gene	Группа Group		
	Здоровые люди Healthy people (n = 40)	АГ без терапии Hypertension without therapy (n = 27)	АГ терапия Hypertension with therapy (n = 26)
<i>FOXP3</i>	0,026±0,004	1,685±0,180*	1,290±0,480*
<i>CD8A</i>	0,023±0,006	5,450±5,780*	0,870±0,038* **
<i>IL2R</i>	0,029±0,009	3,600±0,240*	0,098±0,027* **
<i>RORγ</i>	0,0070±0,0002	1,070±0,600*	0,088±0,200* **

Примечание. * – различия значимы при сравнении с контрольной группой, ** – различия значимы при сравнении с группой АГ без терапии. В скобках представлен объем выборки.

Note. *, differences are significant when compared with the control group; **, differences are significant when compared with the group of hypertension without therapy.

ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* В ЛПК МУЖЧИН И ЖЕНЩИН

TABLE 3. RELATIVE LEVEL OF *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* GENES TRANSCRIPTS IN PBL OF MEN AND WOMEN

Ген Gene	Группа Group					
	Мужчины Men			Женщины Women		
	Здоровые Healthy (n = 20)	АГ без терапии Hypertension without therapy (n = 14)	АГ терапия Hypertension with therapy (n = 12)	Здоровые Healthy (n = 20)	АГ без терапии Hypertension without therapy (n = 13)	АГ терапия Hypertension with therapy (n = 14)
<i>FOXP3</i>	0,016±0,007	2,370±0,780*	2,390±0,130*	0,038±0,006	1,110±0,440*	0,180±0,110* **
<i>CD8A</i>	0,025±0,005	2,730±0,550*	1,024±0,490* **	0,020±0,005	8,1700±0,6200*	0,720±0,060* **
<i>IL2R</i>	0,038±0,006	1,810±0,640*	0,057±0,020**	0,031±0,010	5,400±2,160*	0,137±0,047* **
<i>RORγ</i>	0,010±0,004	2,010±1,000*	0,062±0,017* **	0,003±0,001	0,170±0,045*	0,125±0,090* **

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

Тотальную РНК (тотРНК) выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) с помощью реагента PureZole (Bio-Rad, США) и обрабатывали ДНКазой (1 ед. а). Качество тотРНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Количество тотРНК оценивали спектрофотометрически (SmartSpecPlus, Bio-Rad, США). Для синтеза первой цепи использовали набор MMLV RT kit (Евроген, Россия). Уровень экспрессии генов *FOXP3*, *CD8A*, *IL2R* и *RORγ* оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени на приборе LightCycler (Roche, Германия). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 50 нг кДНК, по 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл реакционной смеси Screen-Mix SYBR Green (Евроген, Россия) и 16 мкл деионизированной свободной от нуклеаз воды. Протокол ПЦР: денатурация ДНК 5 мин при 95 °С; 40 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 60 °С 30 с; элонгация при 72 °С 30 с. Праймеры конструировали в программе BeaconDesigner 5.0. Последовательность праймеров для анализа экспрессии генов представлены в таблице 1. В качестве референсных использовали гены *18S rRNA* и *GAPDH*. Олигонуклеотиды синтезированы в фирме Синтол (Россия). ПЦР повторяли не менее 3 раз. Эффективность ПЦР оценивали с помощью стандартной кривой. Относительный уровень транскриптов рассчитывали по формуле: уровень транскриптов = $2^{-\Delta Ct}$ (референсный) – Ct (тестовый образец), где Ct – значение пороговых циклов.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statgraphics 2.1. Для анализа статистической значимости различий уровней транскриптов был использован непараметрический критерий U Вилкоксона–Манна–Уитни. Данные в таблицах представлены в виде среднего значения (M) ± ошибка среднего (m).

Результаты

Уровень транскриптов гена *FOXP3* в ЛПК здоровых людей оказался значительно ниже, чем пациентов с АГ независимо от того, принимали они или не принимали блокаторы β-адренорецепторов ($p < 0,001$) (табл. 2). Уровень мРНК гена *RORγ* в ЛПК пациентов с АГ не получавших метапролол или бисопролол, значительно превышал таковой у здоровых индивидов ($p < 0,01$) (табл. 2). Содержание транскриптов этого гена в ЛПК пациентов с АГ без терапии выше, чем у пациентов с АГ, принимающих блокаторы β-адренорецепторов ($p < 0,01$). Уровень

мРНК генов *CD8A* и *IL2R* в ЛПК здоровых людей и гипертоников был аналогичен уровню транскриптов гена *RORγ* (табл. 2).

Количество транскриптов всех изученных генов в ЛПК мужчин и женщин как из контрольной группы, так и группы пациентов с АГ не отличалось ($p > 0,05$) (табл. 3). Необходимо отметить, что в группе женщин с АГ, принимающих гипотензивные препараты содержание мРНК гена *FOXP3* было ниже, чем у пациенток без соответствующей терапии, тогда как у мужчин этот показатель был практически одинаковым.

Обсуждение

В последнее время возрастает интерес к проблеме участия врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе и артериальной гипертензии [7, 38]. Еще в начале 90-х годов прошлого столетия стало известно, что развитие артериальной гипертензии может быть предотвращено иммуносупрессией и, наоборот, индуцироваться после адаптивного переноса лимфоидных клеток от крыс с генетически запрограммированным высоким кровяным давлением к нормотензивным животным [32]. Об активации иммунной системы и важной роли клеток адаптивного иммунитета в поддержании гипертензии свидетельствует ряд фактов. Оказалось, что у гипертоников повышено количество провоспалительных цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток и $CD45RO$ клеток памяти по сравнению со здоровыми донорами [16, 29, 41]. Циркулирующие уровни хемокинов СХС типа (регулирующие миграцию нейтрофилов и лимфоцитов в поврежденную ткань) и их рецепторов также были значительно выше у больных с повышенным давлением крови, чем у людей из контрольной группы [41]. При АГ наблюдается повышение соотношения $CD4^+/CD8^+$ лимфоцитов [29, 34]. У гипертоников по сравнению со здоровыми людьми увеличен пул циркулирующих $CD4^+$ Т-клеток, продуцирующих интерлейкин-17, а также $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, которые продуцируют интерферон-γ [16]. Повышение уровня провоспалительных цитокинов в сосудистой сети приводит к ремоделированию сосудов, пролиферацию гладкомышечных клеток и индукцию окислительного стресса [31]. Th17 также продуцируют другие воспалительные цитокины, которые могут играть важную роль при воспалительных заболеваниях, в частности TNFα, известный медиатор воспалительных реакций, а также IL-22 и IL-26.

Об активации Т-клеточного звена адаптивного иммунитета свидетельствуют данные, полученные в нашем исследовании. У пациентов с АГ по сравнению со здоровыми людьми отмечено повышение уровня транскриптов генов, кодирующих маркеры дифференцировки Т-клеток (*FOXP3*, *ROR γ* , *CD8A*, *IL2R*). Повышение транскрипционной активности гена *ROR γ* в ЛПК индивидов со стабильно высоким давлением крови, вероятно, связано с увеличением количества Th17. В поддержании их фенотипа играют роль ряд транскрипционных факторов – STAT3, IRF4 и BATF. Тем не менее отличительной чертой этого типа клеток является экспрессия гена *ROR γ* [35]. Увеличение процента Th17 в периферической крови характерно для гипертоников [17], что, вероятно, связано с их участием в поддержании высокого давления крови. Так, перенос контрольным крысам активированных Th17 от животных, находящихся на диете с высоким потреблением фруктозы или соли, индуцировало у них повышение давления крови [24]. Перенос клеток Th17 от взрослых крыс со спонтанной гипертензией (SHR) молодым SHR донорам ускоряло развитие у них признаков гипертензии [21].

CD8⁺Т-клетки являются основным источником IFN γ . Они накапливаются в почках при гипертензии. Вероятно, повышение количества этих клеток играет роль в патогенезе АГ. Так, у мышей, лишенных CD8⁺Т-клеток, повышение артериального давления в ответ на инфузию ангиотензина II было слабее, чем у животных дикого типа [37]. Следует отметить, что данные относительно изменения числа клеток, экспрессирующих CD8-антиген при АГ не однозначные. Так в работе Трушиной и соавт. выявлено снижение относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови лиц с АГ и ожирением по сравнению с подобными показателями здоровых индивидов [1]. Снижение количества CD8⁺ клеток в крови пациентов с АГ обнаружено и в исследовании Sereti и соавт. [34]. Этот факт авторы объясняют инфильтрацией CD8⁺Т-лимфоцитов в органы мишени (почки, кровеносные сосуды, селезенку и ткани миокарда). Согласно данным других исследований, у взрослых людей со стабильно высоким давлением крови и у детей с первичной гипертензией наблюдается увеличение числа циркулирующих CD8⁺ клеток [13, 29, 41].

Подмножество CD4⁺Т-клеток экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3. Одним из «ранних» маркеров активации лимфоцитов является

увеличение на их поверхности α -цепи рецептора к IL-2 (CD25). Интенсивность экспрессии этого маркера на регуляторных клетках (CD25^{high}) выше, чем в других субпопуляциях Т-лимфоцитов. Поэтому повышение уровня экспрессии гена *FOXP3* и *IL2R*, вероятно, свидетельствует об увеличении количества Treg-клеток при АГ.

АГ сопровождается развитием хронического вялотекущего воспаления. Тем не менее, по данным литературы не совсем понятно, изменяется или нет при этом заболевании количество Т-регуляторных лимфоцитов. Так, оказалось, что у детей с артериальной гипертензией общий пул Treg-клеток в периферической крови значительно меньше, чем у здоровых детей [12]. Также у них отмечено снижение количества CD45RA наивных Treg, общих CD31 Treg. Однако при этом авторы регистрировали повышение числа CD45RA/активированных Treg и зрелых CD45RACD31 [12]. В исследованиях DeCiuceis и соавт. и Agabiti-Rosei, проведенных среди взрослых индивидов с АГ и без нее, различия в количестве CD4⁺CD25⁺Т-клеток между группами не выявлены [3, 11]. Возможно, наличие вялотекущего хронического воспаления определяет повышенную экспрессию гена *FOXP3*, тогда как при острых патологиях сердечно-сосудистой системы, как правило, наблюдается снижение пула Treg-клеток. Например, у пациентов с острым коронарным синдромом количество Treg было ниже, чем у здоровых индивидуумов [25]. Увеличение содержания транскриптов гена *FOXP3* в ЛПК пациентов с АГ может быть следствием увеличения пула CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Т-клеток. Так, у больных артериальной легочной гипертензией количество этих клеток больше, а CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ значительно меньше, чем у здоровых людей [42]. Снижение пула Treg-лимфоцитов может оказывать негативный эффект на функции сосудов [5]. Увеличение количества Т-регуляторных клеток ассоциировано с ослаблением симптомов гипертензии и признаков повреждения органов-мишеней [10, 40]. Так, адаптивный перенос Treg способствует снижению артериального давления и ослаблению признаков повреждения сердца и почек у экспериментальных животных при ангиотензин-индуцируемой гипертензии [5].

Т-регуляторные клетки представляют субпопуляцию лимфоцитов с противовоспалительной ролью. FoxP3 подавляет функции транскрипционных факторов NFAT (nuclear factor of activated T-cells) и NF- κ B (nuclear factor kappa B), что при-

водит к супрессии транскрипционной активности многих генов, включая *IL2* и генов цитокинов эффекторных Т-клеток [20]. Активность Treg важна для поддержания гомеостаза сердечно-сосудистой системы. Оказалось, что эти клетки инфильтрируются в миокард при ишемической болезни сердца [33]. *In vitro* Т-клетки модулируют фенотип сердечных фибробластов, уменьшают экспрессию актина и металлопротеиназы 3 [33]. Основная функция Т-супрессоров – контролировать силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию функций Т-эффекторных клеток. Еще в работе Ва и соавт. [4] было продемонстрировано, что некоторые клетки иммунной системы при развитии гипертензии могут быть супрессированы. Показано, что прием иммунодепрессантов, например, такролимуса приводит к снижению пула Т-регуляторных клеток ($CD4^+/FoxP3^+$), повышению количества $CD4^+/IL-17^+$ клеток, эндотелиальной дисфункции и гипертензии [8].

Оказалось, что половая принадлежность влияет как на восприимчивость к гипертензии, так и на профиль Т-клеток при гипертензии [6, 9, 36]. Например, инфузия крысам со спонтанной гипертензией ингибитора лимфоцитов микофенолат мофетила способствовала снижению артериального давления у обоих полов [36]. Однако у самок снижение артериального давления было значительнее, чем у самцов. Кроме этого, количество циркулирующих $CD3^+$, $CD4^+$ и провоспалительных $CD3^+CD4^+ROR\gamma^+Th17$ клеток у самок HSR оказалось больше, а иммуносупрессивных $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ Т-регуляторных лимфоцитов, наоборот меньше чем у животных противоположного пола. Также самцы и самки по-разному характеризовались в отношении количества клеток инфильтрированных в почки [36]. На основании полученных результатов авторы заключили, что пол животного влияет на профиль Т-клеток и лимфоциты вносят вклад в поддержание гипертензии у самок SHR. Несколько иные результаты получены в других исследованиях. Прием ацетата дезоксикортикостерона (ДОСА) с физиологическим раствором вместо воды вызывал у крыс линии Sprague Dawley повышение артериального давления, причем у самцов в большей степени, чем у самок [6]. Это сопровождалось увеличением количества провоспалительных Т-клеток в почках. У самок число Treg-клеток было выше, чем у самцов. Введение им антител к CD25 нивелировало половые различия в значении артериального давления. По мнению авторов, эти данные

подтверждают гипотезу о том, что Treg-клетки защищают от развития гипертензии и особенно важны для контроля АД у самок. В представленном нами исследовании значимых различий в уровне экспрессии генов, кодирующих специфические антигены Т-лимфоцитов, в ЛПК мужчин и женщин не выявлено. Тем не менее стоит обратить внимание на тот факт, что прием гипотензивных препаратов по-разному оказывал свой эффект в отношении уровня экспрессии гена *FOXP3* у мужчин и женщин. У мужчин с АГ содержание мРНК этого гена в ЛПК было одинаковым, несмотря на то, находились они на гипотензивной терапии или нет. В то же время у женщин прием метопролола или бисопролола, по всей вероятности, способствовал снижению транскрипционной активности гена *FOXP3* и, вероятно, количества экспрессирующих его клеток, в том числе и Treg.

Согласно данным литературы, различные лекарственные препараты, например, статины и кардиоселективные блокаторы β -адренорецепторов способствуют повышению пула Treg-клеток [26] и снижению содержания IL-17 в плазме крови [17]. Таким образом, гипотензивные и гиполипидимические препараты могут оказывать иммуномодулирующий эффект и восстанавливать баланс регуляторных и эффекторных Т-лимфоцитов при АГ. Об этом свидетельствуют и результаты проведенного нами исследования. Так, в ЛПК пациентов, которые принимали кардиоселективные блокаторы β -адренорецепторов уровень транскриптов *ROR\gamma*, *CD8A*, *IL2R* был существенно ниже, чем у пациентов без гипотензивной терапии. Снижение транскрипционной активности гена *FOXP3* на фоне приема лекарств наблюдали только у женщин. Симпатическая нервная система играет важную роль во взаимодействии между мозгом и иммунитетом [27]. Клетки иммунной системы экспрессируют адренорецепторы (АР), активирующиеся под влиянием норадреналина и адреналина. Причем тип и плотность АР определяется свойствами иммунных клеток. Как оказалось, наибольшее количество β -адренорецепторов экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов [19]. Среди Т-клеток, наибольшее их количество регистрируется на поверхности Т-супрессоров, а наименьшее – Т-хелперов. Активация β -АР на лимфоцитах может приводить к стимуляции иммунитета [22]. Следовательно, применение блокаторов β -АР способно оказывать противовоспалительное и иммуномодулирующее действие при АГ.

Заключение

Таким образом, в представленной работе выявлен повышенный уровень мРНК генов *FOXP3*, *IL2R*, *CD8A*, *RORγ* в ЛПК пациентов с АГ по сравнению со здоровыми людьми, что свидетельствует об активации иммунного ответа при формировании стабильно высокого давления крови. Применение кардиоселективных блокаторов адренорецепторов, вероятно, способству-

ет снижению уровню транскрипционной активности этих генов и воспалительных процессов при АГ.

Финансирование

Исследования выполнялись в рамках выполнения НИР (№ 0218-2019-0077) ИБ КарНЦ РАН на научном оборудовании (НО) Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Список литературы / References

1. Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Хорхе С.С., Богданов А.Р., Сенцова Т.Б., Залетова Е.С., Кузнецов В.Д. Клеточный иммунитет у больных с артериальной гипертензией и ожирением // Вопросы питания, 2012. № 6. С. 19-26. [Trushina E.N., Mustafina O.K., Jorge S.S., Bogdanov A.R., Sentsova T.B., Zaletova E.S., Kuznetsov V.D. The cell immunity in patients with arterial hypertension and obesity. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2012, no. 6, pp. 19-26. (In Russ.)]
2. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 347-354. Freidlin I.S. Regulatory T-cells: origin and function. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 347-354. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-347-354.
3. Agabiti-Rosei C., Trapletti V., Piantoni S., Airò P., Tincani A., de Ciuceis C., Rossini C., Mittempergher F., Titi A., Portolani N., Caletti S., Coschignano M.A., Porteri E., Tiberio G.A.M., Pileri P., Solaini L., Kumar R., Ministrini S., Agabiti Rosei E., Rizzoni D. Decreased circulating T regulatory lymphocytes in obese patients undergoing bariatric surgery. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 5, 0197178. doi: 10.1371/journal.pone.0197178.
4. Ba D., Takeichi N., Kodama T., Kobayashi H. Restoration of T cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts. *J. Immunol.*, 1982, Vol. 128, no. 3, pp. 1211-1216.
5. Barhoumi T., Kasal D.A., Li M.W., Shbat L., Laurant P., Neves M.F., Paradis P., Schiffrin E.L. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 3, pp. 469-476.
6. Belanger K.M., Crislip G.R., Gillis E.E., Abdelbary M., Musall J.B., Mohamed R., Baban B., Elmarakby A., Brands M.W., Sullivan J.C. Greater T regulatory cells in females attenuate DOCA-salt induced increases in blood pressure versus males. *Hypertension*, 2020, Vol. 75, no. 6, pp. 1615-1623.
7. Caillon A., Paradis P., Schiffrin E.L. Role of immune cells in hypertension. *Br. J. Pharmacol.*, 2019, Vol. 176, no. 12, pp. 1818-1828.
8. Chiasson V.L., Talreja D., Young K.J., Chatterjee P., Banes-Berceli A.K., Mitchell B.M. FK506 binding protein 12 deficiency in endothelial and hematopoietic cells decreases regulatory T cells and causes hypertension. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 6, pp. 1167-1175.
9. Crislip G.R., Sullivan J.C. T-cell involvement in sex differences in blood pressure control. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2016, Vol. 130, no. 10, pp. 773-783.
10. Crowley S.D., Song Y.S., Lin E.E., Griffiths R., Kim H.S., Ruiz P. Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2010, Vol. 298, no. 4, pp. R1089-R1097.
11. de Ciuceis C., Rossini C., Airò P., Scarsi M., Tincani A., Tiberio G.A.M., Piantoni S., Porteri E., Solaini L., Duse S., Semeraro F., Petroboni B., Mori L., Castellano M., Gavazzi A., Agabiti Rosei C., Agabiti Rosei E., Rizzoni D. Relationship between different subpopulations of circulating CD4⁺ T-lymphocytes and microvascular structural alterations in humans. *Am. J. Hypertens.*, 2017, Vol. 30, no. 1, pp. 51-60.
12. Gackowska L., Michałkiewicz J., Helmin-Basa A., Kłosowski M., Niemirska A., Obrycki Ł., Kubiszewska I., Wierzbicka A., Litwin M. Regulatory T-cell subset distribution in children with primary hypertension is associated with hypertension severity and hypertensive target organ damage. *J. Hypertens.*, 2020, Vol. 38, no. 4, pp. 692-700.
13. Gackowska L., Michałkiewicz J., Niemirska A., Helmin-Basa A., Kłosowski M., Kubiszewska I., Obrycki Ł., Szalecki M., Wierzbicka A., Kułaga Z., Wiese M., Litwin M. Loss of CD31 receptor in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in children with primary hypertension is associated with hypertension severity and hypertensive target organ damage. *J. Hypertens.*, 2018, Vol. 36, no. 11, pp. 2148-2156.
14. Harrison D.G., Guzik T.J., Lob H.E., Madhur M.S., Marvar P.J., Thabet S.R., Vinh A., Weyand C.M. Inflammation, Immunity and Hypertension. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 2, pp. 132-140.
15. Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 11, pp. 21463-21473.
16. Itani H.A., McMaster W.G. Jr., Saleh M.A., Nazarewicz R.R., Mikolajczyk T.P., Kaszuba A.M., Konior A., Prejbisz A., Januszewicz A., Norlander A.E., Chen W., Bonami R.H., Marshall A.F., Poffenberger G., Weyand C.M.,

Madhur M.S., Moore D.J., Harrison D.G., Guzik T.J. Activation of human T cells in hypertension: studies of humanized mice and hypertensive humans. *Hypertension*, 2016, Vol. 68, no. 1, pp. 123-132.

17. Ji Q., Cheng G., Ma N., Huang Y., Lin Y., Zhou Q., Que B., Dong J., Zhou Y., Nie S. Circulating Th1, Th2, and Th17 levels in hypertensive patients. *Dis. Markers*, 2017, Vol. 2017, 7146290. doi: 10.1155/2017/7146290.

18. Katsuki M., Hirooka Y., Kishi T., Sunagawa K. Decreased proportion of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells contributes to the development of hypertension in genetically hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 2015, Vol. 33, no. 4, pp. 773-783.

19. Khan M.M., Sansoni P., Silverman E.D., Engleman E.G., Melmon K.L. Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 1986, Vol. 35, no. 7, pp. 1137-1142.

20. Kim C.H. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2009, Vol. 665, pp. 17-29.

21. Kim J.Y., Eunjo L., Koo S., Kim C.-W., Kim I. Transfer of Th17 from adult spontaneous hypertensive rats accelerates development of hypertension in juvenile spontaneous hypertensive rats. *Biomed Res. Int.*, 2021, 6633825. doi: 10.1155/2021/6633825.

22. Kohm A.P., Sanders V.M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacol. Rev.*, 2001, Vol. 53, no. 4, pp. 487-525.

23. Koushki K., Shahbaz S. K., Mashayekhi K., MahvashSadeghi M., Zayeri Z.D., Taba M.Y., Banach M., Al-Rasadi K., Johnston T.P., Amirhossein Sahebkar A. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammasome and toll-like receptor pathways. *Clin. Rev. Allergy Immun.*, 2020, Vol. 60, no. 2, pp. 175-199.

24. Lee E., Kim N., Kang J., Yoon S., Lee H.A., Jung H., Kim S.H., Kim I. Activated pathogenic Th17 lymphocytes induce hypertension following high-fructose intake in Dahl salt-sensitive but not Dahl salt-resistant rats. *Dis. Model. Mech.*, 2020, Vol. 13, no. 5, dmm044107. doi: 10.1242/dmm.044107.

25. Li Q., Wang Y., Chen K., Zhou Q., Wei W., Wang Y. The role of oxidized low-density lipoprotein in breaking peripheral Th17/Treg balance in patients with acute coronare syndrome. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 2010, Vol. 394, no. 3, pp. 836-842.

26. Liu Z., Zhao Y., Wei F., Ye L., Lu F., Zhang H., Diao Y., Song H., Qi Z. Treatment with telmisartan/rosuvastatin combination has a beneficial synergistic effect on ameliorating Th17/Treg functional imbalance in hypertensive patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014, Vol. 233, no. 291, e299. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.004.

27. Marino F., Cosentino M. Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids*, 2013, Vol. 45, no. 1, pp. 55-71.

28. Mikolajczyk T.P., Guzik T.J. Adaptive immunity in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2019, Vol. 21, no. 9, 68. doi: 10.1007/s11906-019-0971-6.

29. Ni X., Wang A., Zhang L., Shan L.-Y., Zhang H.-C., Li L., Si J.-Q., Luo J., Li X.-Z., Ma K.-T. Up-regulation of gap junction in peripheral blood T lymphocytes contributes to the inflammatory response in essential hypertension. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 9, e0184773. doi: 10.1371/journal.pone.0184773.

30. Pinto J.P., Dias V., Zoller H., Porto G., Carmo H., Carvalho F., de Sousa M. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology*, 2010, Vol. 130, no. 2, pp. 217-230.

31. Rai A., Narisawa M., Li P., Pia L., li Y., Yang G., Cheng X.W. Adaptive immune disorders in hypertension and heart failure: focusing on T-cell subset activation and clinical implications. *J. Hypertens.*, 2020, Vol. 38, no. 10, pp. 1878-1889.

32. Renaudin C., Bataillard A., Sassard J. Partial transfer of genetic hypertension by lymphoid cells in Lyon rats. *J. Hypertens.*, 1995, Vol. 13, no. 12, Pt 2, pp. 1589-1592.

33. Saxena A., Dobaczewski M., Rai V., Haque Z., Chen W., Li N., Frangogiannis N.G. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2014, Vol. 307, no. 8, pp. H1233-H1242.

34. Sereti E., Stamatelopoulos K.S., Zakopoulos N.A., Evangelopoulou A., Mavragani C.P., Evangelopoulos M.E. Hypertension: an immune related disorder? *Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 212, 108247. doi: 10.1016/j.clim.2019.108247.

35. Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.*, 2008, Vol. 223, pp. 87-113.

36. Tipton A.J., Baban B., Sullivan J.C. Female spontaneously hypertensive rats have greater renal anti-inflammatory T lymphocyte infiltration than males. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2012, Vol. 303, no. 4, pp. 359-367.

37. Trott D.W., Thabet S.R., Kirabo A., Saleh M.A., Itani H., Norlander A.E., Wu J., Goldstein A., Arendshorst W.J., Madhur M.S., Chen W., Li C.I., Shyr Y., Harrison D.G. Oligoclonal CD8⁺ T cells play a critical role in the development of hypertension. *Hypertension*, 2014, Vol. 64, no. 5, pp. 1108-1115.

38. Wenzel U., Turner J.E., Krebs C., Kurts C., Harrison D.G., Ehmke H. Immune mechanisms in arterial hypertension. *J. Am. Nephrol.*, 2016, Vol. 27, no. 3, pp. 677-686.

39. Williams B., Mancia G., Spiering W., Agabiti Rosei T., Azizi M., Burnier M., Clement D.L., Coca A., de Simone G., Dominiczak A., Kahan T., Mahfoud F., Redon J., Ruilope L., Zanchetti A., Kerins M., Kjeldsen S.E., Kreutz R., Laurent S., Lip G.Y.H., McManus R., Narkiewicz K., Ruschitzka F., Schmieder R.E., Shlyakhto E., Tsioufis C.,

Aboyans V., Desormais I. Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *Blood Press.*, 2018, Vol. 27, no. 6, pp. 314-340.

40. Xu L., Chen G., Liang Y., Zhou C., Zhang F., Fan T., Chen X., Zhou H., Yuan W. T helper 17 cell responses induce cardiac hypertrophy and remodeling in essential hypertension. *Pol. Arch. Intern. Med.*, 2021, Vol. 131, no. 3, pp. 257-265.

41. Youn J.-C., Yu H.T., Lim B.J., Koh M.J., Lee J., Chang D.-Y., Choi Y.S., Lee S.-H., Kang S.-M., Jang Y., Yoo O.J., Shin E.-C., Park S. Immunosenescent CD8⁺ T Cells and C-X-C chemokine receptor Type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension*, 2013, Vol. 62, no. 1, pp. 126-133.

42. Zhu R., Chen L., Xiong Y., Wang N., Xie X., Hong Y., Meng Z. An upregulation of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells with suppressive function through interleukin 2 pathway in pulmonary arterial hypertension. *Exp. Cell Res.*, 2017, Vol. 358, no. 2, pp. 182-187.

Авторы:

Топчиева Л.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Корнева В.А. — к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии, Медицинский институт ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Мальшева И.Е. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Authors:

Topchieva L.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Korneva V.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Faculty Therapy, Phthisiology, Infectious Diseases and Epidemiology, Medical Institute, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Malysheva I.E., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Поступила 12.07.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 12.07.2021
Accepted 07.11.2021