



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-2-45-51>  
УДК 616.1-005.4-036.12-008.853:616.13-004.6:612.015.39

# Циркулирующие FoxP3+ Т-лимфоциты при хронической ишемической болезни сердца: взаимосвязь с тяжестью атеросклероза и состоянием обмена липидов

И.В. Кологривова, Т.Е. Сулова, О.А. Кошельская, О.А. Харитоновна,  
О.А. Трубачева, Е.С. Кравченко

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,  
634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

## Аннотация

**Введение.** Транскрипционный фактор forkhead box protein P3 (FoxP3) является главным регулятором активности Т-регуляторных (Трег) лимфоцитов и может экспрессироваться в Т-конвенционные лимфоциты (Tconv) на этапе их активации.

**Цель исследования:** изучение количественного содержания и качественных характеристик FoxP3+ Tconv и Трег-лимфоцитов и их взаимосвязи с показателями липидного обмена у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС) в зависимости от тяжести коронарного атеросклероза.

**Материал и методы.** В исследование вошли 14 пациентов с документированной хронической ИБС (8 мужчин и 6 женщин; средний возраст – 66,5 ± 9,0 лет). Всем пациентам проводили ангиографию, на основании данных которой оценивали тяжесть атеросклероза путем расчета индекса Gensini Score (GS). В зависимости от выраженности коронарного атеросклероза пациенты были разделены на 2 группы: в 1-ю группу вошли пациенты с GS < 20 баллов, во 2-ю группу – с GS ≥ 20 баллов. У всех пациентов определяли абсолютное и относительное содержание FoxP3+ Трег и Tconv-лимфоцитов и уровень ядерной транслокации FoxP3 в них методом проточной цитометрии с визуализацией. Методом иммуноферментного анализа оценивали концентрацию инсулина, пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинного типа 9 (PCSK9), сортилина. Стандартными методами определяли содержание показателей углеводного обмена и липидного спектра крови.

**Результаты.** Количественное содержание Трег- и Tconv-лимфоцитов не различалось в группах пациентов с различной выраженностью атеросклероза. Однако группа пациентов с GS ≥ 20 баллов характеризовалась более низкой интенсивностью флуоресценции нуклеарного FoxP3 в Трег-лимфоцитах и Tconv-лимфоцитах. В общей выборке пациентов индекс GS имел тенденцию к обратной взаимосвязи с интенсивностью флуоресценции FoxP3 в ядрах Трег-лимфоцитов ( $r_s = -0,476$ ) и Tconv-лимфоцитов ( $r_s = -0,526$ ). Количественные и качественные показатели FoxP3+ Трег и FoxP3+ Tconv-лимфоцитов характеризовались наличием многочисленных корреляционных взаимосвязей с содержанием PCSK9, сортилина, аполипопротеина В (апо-В) и соотношением триглицеридов/холестерола липопротеинов высокой плотности (ТГ/ХС-ЛВП).

**Заключение.** Интенсивность флуоресценции FoxP3 в ядре Tconv-лимфоцитов является более чувствительным маркером иммунорегуляторного дисбаланса при хронической ИБС по сравнению с количественным содержанием FoxP3+ Т-клеток в циркулирующей крови, которое остается практически неизменным по мере нарастания выраженности атеросклероза. При этом маркеры метаболизма липидов находятся в тесной взаимосвязи как с количественными, так и качественными параметрами FoxP3+ Т-лимфоцитов.

<b>Ключевые слова:</b>	транскрипционный фактор FoxP3, регуляторные Т-лимфоциты, конвенционные Т-лимфоциты, проточная цитометрия с визуализацией, PCSK9, сортилин, ишемическая болезнь сердца.
<b>Конфликт интересов:</b>	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
<b>Прозрачность финансовой деятельности:</b>	никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Статья подготовлена в рамках темы фундаментальных исследований № АААА-А15-115123110026-3.

✉ Кологривова Ирина Вячеславовна, e-mail: [ikologrivova@gmail.com](mailto:ikologrivova@gmail.com).

**Соответствие принципам этики:** информированное согласие получено от каждого пациента. Исследование одобрено этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 146 от 16.06.2016 г.).

**Для цитирования:** Кологривова И.В., Сулова Т.Е., Кошельская О.А., Харитоновна О.А., Трубачева О.А., Кравченко Е.С. Циркулирующие FoxP3+ Т-лимфоциты при хронической ишемической болезни сердца: взаимосвязь с тяжестью атеросклероза и состоянием обмена липидов. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2021;36(2):45–51. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-2-45-51>.

## Circulating FoxP3+ T-lymphocytes in chronic coronary artery disease: Associations with the severity of atherosclerosis and lipid metabolism

Irina V. Kologrivova, Tatiana E. Suslova, Olga A. Koshelskaya,  
Olga A. Kharitonova, Oksana A. Trubacheva, Elena S. Kravchenko

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,  
111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

### Abstract

**Introduction.** The transcription factor forkhead box protein P3 (FoxP3) is a major regulator of T-regulatory (Treg) lymphocytes and may be expressed in T-conventional (Tconv) lymphocytes at the stage of their activation. The aim of the present study was to evaluate the quantities and features of FoxP3+ Tconv and Treg lymphocytes and their relationships with the parameters of lipid metabolism in patients with chronic coronary artery disease (CAD) depending on the severity of coronary atherosclerosis.

**Material and Methods.** The study comprised 14 patients (8 men and 6 women) aged  $66.5 \pm 9.0$  years with verified chronic CAD. All the patients underwent coronary angiography and assessment of atherosclerosis severity by calculation of Gensini Score index (GS). Patients were divided into the following groups: group 1 had  $GS < 20$ ; group 2 had  $GS \geq 20$ . The absolute and relative counts of FoxP3+ Treg and Tconv lymphocytes and degree of FoxP3 nuclear translocation were evaluated in all patients by imaging flow cytometry. Concentrations of insulin, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), and sortilin were assessed using enzyme-linked immunosorbent assay. Parameters of glucose metabolism and serum lipid spectrum were determined by the standard methods.

**Results.** Counts of Treg and Tconv lymphocytes did not differ between groups of patients with different severity of atherosclerosis. However, patients with  $GS \geq 20$  had lower intensity of nuclear FoxP3 fluorescence in Treg and Tconv lymphocytes. GS index in the entire group of CAD patients tended to be negatively associated with the fluorescence intensity of FoxP3 in the nuclei of Treg ( $r_s = -0.476$ ) and Tconv lymphocytes ( $r_s = -0.526$ ). Multiple correlations existed between the quantitative and qualitative parameters of FoxP3+ Treg and FoxP3+ Tconv lymphocytes and metabolic parameters such as concentrations of PCSK9, sortilin, apolipoprotein B, and triglycerides/HDL cholesterol ratio.

**Conclusion.** FoxP3 fluorescence intensity in the nuclei of T conventional lymphocytes was more sensitive marker of immunoregulatory imbalance in chronic CAD compared to counts of FoxP3+ T cells in the peripheral blood, which remained nearly unaltered with the increase in atherosclerosis severity. At the same time, markers of lipid metabolism were tightly associated with both quantitative and qualitative features of FoxP3+ T-lymphocytes.

**Keywords:** transcription factor FoxP3, regulatory T-lymphocytes, conventional T-lymphocytes, imaging flow cytometry, PCSK9, sortilin, coronary artery disease.

**Conflict of interest:** the authors do not declare a conflict of interest.

**Financial disclosure:** no author has a financial or property interest in any material or method mentioned. This work was completed within the framework of fundamental study No. AAAA-A15-115123110026-3.

**Adherence to ethical standards:** informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committee of Cardiology Research Institute of Tomsk NRMС (protocol No. 146 from 16.06.2016).

**For citation:** Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Kharitonova O.A., Trubacheva O.A., Kravchenko E.S. Circulating FoxP3+ T-lymphocytes in chronic coronary artery disease: Associations with the severity of atherosclerosis and lipid metabolism. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2021;36(2):45–51. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-2-45-51>.

## Введение

Т-регуляторные (Treg) лимфоциты обладают значительным иммунорегуляторным потенциалом в ходе развития атеросклероза. Показано сниженное содержание Treg-лимфоцитов в нестабильных бляшках по сравнению с нормальной стенкой сосуда и со стабильными бляшками [1]. Искусственно индуцированный дефицит Treg-лимфоцитов в циркуляции ассоциировался с неэффективностью агрессивной липидснижающей терапии в отношении предотвращения прогрессии атеросклероза [2].

Транскрипционный фактор forkhead box protein P3 (FoxP3) является главным регулятором активности Treg-лимфоцитов [3]. До недавнего времени внутридермальный маркер FoxP3 считался «золотым стандартом» определения Treg. Однако вскоре были получены сведения о том, что конвенционные («нерегуляторные») Т-лимфоциты (Tconv) также экспрессируют FoxP3 на определенном этапе активации. Но в Tconv-клетках FoxP3 преимущественно локализовался в ядре и не приводил к индукции иммуносупрессорной активности клеток, характерной для Treg-лимфоцитов [3].

Ранее мы показали, что иммунорегуляторный дисбаланс при нарушениях углеводного обмена и развитии диастолической дисфункции проявляется, в том числе в снижении содержания циркулирующих FoxP3+ Treg-лимфоцитов [4]. Однако содержание Treg-клеток в периферической крови не всегда отражает тяжесть развития атеросклероза, что затрудняет трансляцию экспериментальных данных в клинику [5]. В то же время новые технологии, доступные в современной проточной цитометрии, позволяющие оценивать субклеточную локализацию внутриклеточных маркеров, которая зачастую является более чувствительной к воздействию различных патогенетических факторов. Данные об особенностях конвенционных FoxP3+ Т-лимфоцитов при стабильной ишемической болезни сердца (ИБС) и о субклеточной локализации FoxP3 в конвенционных и регуляторных лимфоцитах в доступной литературе на сегодняшний день отсутствуют.

Появляется все больше доказательств в пользу тесной взаимосвязи между липидным обменом и Treg-лимфоцитами [6]. Учитывая липидную природу нарушений, лежащих в основе атерогенеза, изучение взаимодействия между FoxP3+ клетками и показателями липидного обмена приобретает особую актуальность. В последнее время внимание мирового сообщества привлекает пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), которая является ферментом, опосредующим деградацию рецепторов к холестеролу липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП) [7]. Сортилин представляет собой внутриклеточный высокоаффинный рецептор PCSK9 и оказывает влияние на ее секрецию клетками печени [8]. Сведения о вкладе данных маркеров липидного обмена в иммунологическую регуляцию у пациентов с атеросклерозом являются крайне немногочисленными и зачастую противоречивыми.

Цель исследования: изучение количественного содержания и качественных характеристик FoxP3+ Tconv и Treg-лимфоцитов и их взаимосвязи с показателями липидного обмена у пациентов с хронической ИБС в зависимости от тяжести коронарного атеросклероза.

## Материал и методы

В исследование вошли 14 пациентов с документированной хронической ИБС, госпитализированных

в клинику НИИ кардиологии Томского НИМЦ. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом и составлен в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения являлись перенесенное менее 6 мес. назад острое сосудистое осложнение или аортокоронарное шунтирование, развитие или обострение воспалительных заболеваний, тяжелая сопутствующая патология (печеночная, почечная недостаточность, онкологические заболевания), отказ от участия в исследовании. Всем пациентам проводилась ангиография на ангиографическом комплексе Artis one и Digitron-3NAC компьютерной системе (Siemens Shenzhen Magnetic Resonance Ltd., Shenzhen, China). Тяжесть атеросклероза оценивалась путем расчета индекса Gensini Score (GS) [9]. Медиана GS в общей выборке пациентов составила 20 баллов. Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от значений GS: в 1-ю группу вошли пациенты с GS < 20 баллов, во 2-ю группу – с GS ≥ 20 баллов (табл. 1).

Содержание FoxP3+ Treg- и Tconv-лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии с визуализацией (прибор Amnis FlowSight, Luminex, США) во фракции мононуклеарных лейкоцитов, полученных из гепаринизированной крови методом центрифугирования на градиенте плотности Histoopaque 1077, Sigma Aldrich, USA). Для фенотипирования клеток использовали моноклональные антитела FITC-анти-CD4, APC-анти-CD25, PE-анти-FoxP3 и 7-амино-актиномицин Д для окрашивания ядра (7-AAD) (BD eBiosciences, USA). Клетки с фенотипом CD4+FoxP3+CD25<sup>high</sup> являлись Treg-лимфоцитами; клетки с фенотипом CD4+FoxP3+CD25<sup>lo</sup> – Tconv-лимфоцитами. Для обработки данных использовали программное обеспечение INSPIRE и IDEAS 6.2 (Amnis, Luminex). Для оценки уровня ядерной локализации FoxP3 применяли мастер обработки изображений Nuclear Localization Wizard. Рассчитывали относительное и абсолютное количество клеток, используя результаты общего анализа крови.

Стандартные биохимические методы применялись для оценки содержания глюкозы в крови, гликированного гемоглобина и параметров липидного спектра (общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерол липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛВП), ХС липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП), аполипопротеинов В (апо-В) и аполипопротеинов А<sub>1</sub> (апо-А<sub>1</sub>)). Методом иммуноферментного анализа определяли содержание инсулина (Accubind, Monobind, США), PCSK9 (R&D Systems, США), сортилина (Aviscera Bioscience, США).

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Для описания признаков с отличным от нормального распределением использовали медиану и межквартильный интервал. Различия числовых характеристик в двух независимых группах пациентов выявляли с помощью критерия Манна – Уитни. Для сравнения качественных и полуколичественных признаков применяли точный критерий Фишера. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ) использовали для оценки взаимосвязи между признаками. Результаты статистического анализа считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of recruited patients

Параметры Parameters	Пациенты с GS < 20 баллов, n = 6 Patients with GS < 20, n = 6	Пациенты с GS ≥ 20 баллов, n = 8 Patients with GS ≥ 20, n = 8	p
Пол (мужчины/женщины) Sex (men/women)	2/4	6/2	0,277
Возраст, лет Age, years	68,0 (66,0; 69,0)	58,0 (50,0; 68,0)	0,108
Пациенты с инфарктом миокарда в анамнезе, n (%) Patients with history of myocardial infarction, n (%)	1 (17)	3 (38)	0,580
Пациенты с артериальной гипертензией, n (%) Patients with hypertension, n (%)	6 (100)	8 (100)	–
Длительность артериальной гипертензии, лет Hypertension duration, years	19,5 (15,0; 20,0)	17,5 (11,0; 35,0)	0,987
Пациенты с сахарным диабетом 2-го типа, n (%) Patients with type 2 diabetes mellitus, n (%)	3 (50)	4 (50)	0,998
Длительность сахарного диабета 2-го типа, лет Duration of diabetes mellitus type 2, years	0,5 (0; 3,0)	1,5 (0; 7,0)	0,573
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст. Systolic blood pressure, mmHg	124,0 (108,5; 139,5)	138,0 (124,0; 150,0)	0,228
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст. Diastolic blood pressure, mmHg	71,0 (61,5; 82,0)	77,5 (65,0; 78,0)	0,755
Пациенты-курильщики, n (%) Smokers, n (%)	1 (17)	2 (25)	0,998
Терапия статинами, n (%) Statin therapy, n (%)	6 (100)	8 (100)	–
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	28,8 (25,7; 32,0)	29,7 (24,4; 32,5)	0,950
Окружность талии, см Waist circumference, cm	96,0 (93,0; 97,0)	104,0 (98,0; 110,5)	0,284
Индекс Gensini Score, баллы Gensini Score index, points	15,5 (0; 17,5)	44,0 (36,0; 101,3)	0,001

## Результаты

Пациенты 1-й и 2-й групп не различались по отношению и абсолютному содержанию FoxP3+ Treg- и Tconv-лимфоцитов, а также по доле T-лимфоцитов с ядерной локализацией FoxP3 в зависимости от величин

GS. Однако в группе пациентов с GS > 20 баллов мы обнаружили более низкую интенсивность флуоресценции нуклеарного FoxP3 в Treg-лимфоцитах и статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции FoxP3 в ядре Tconv-лимфоцитов (табл. 2).

Таблица 2. FoxP3+ субпопуляции T-регуляторных и T-конвенционных лимфоцитов у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца в зависимости от величины индекса Gensini Score

Table 2. FoxP3+ subpopulations of T-regulatory and T-conventional lymphocytes in patients with chronic coronary artery disease depending on the Gensini Score values

Параметры Parameters	Пациенты с GS < 20 баллов, n = 6 Patients with GS < 20, n = 6	Пациенты с GS ≥ 20 баллов, n = 8 Patients with GS ≥ 20, n = 8	p
Относительное содержание FoxP3+ Treg, % FoxP3+ Treg frequency, %	7,94 (6,20; 9,54)	6,66 (6,20; 7,75)	0,414
Абсолютное содержание FoxP3+ Treg, ×10 <sup>7</sup> /л FoxP3+ Treg absolute counts, ×10 <sup>7</sup> /L	7,56 (5,61; 8,47)	7,79 (3,85; 11,41)	0,973
Относительное содержание FoxP3+ Tconv, % FoxP3+ Tconv frequency, %	1,53 (1,19; 1,77)	1,59 (1,45; 1,94)	0,755
Абсолютное содержание FoxP3+ Tconv, ×10 <sup>7</sup> /л FoxP3+ Tconv, absolute counts, ×10 <sup>7</sup> /L	1,51 (0,69; 1,60)	1,53 (0,79; 2,65)	0,662
Частота Treg-клеток с ядерной локализацией FoxP3, % Frequency of Tregs with FoxP3 nuclear localization, %	98,40 (96,80; 99,10)	98,20 (93,70; 98,60)	0,662
Абсолютное содержание Treg-клеток с ядерной локализацией FoxP3, ×10 <sup>7</sup> /л Absolute counts of Tregs with FoxP3 nuclear localization, ×10 <sup>7</sup> /L	6,86 (5,43; 8,31)	7,70 (3,63; 11,24)	0,852
FoxP3 Bright Detail Intensity в ядре Treg FoxP3 Bright Detail Intensity in Treg nucleus	32,50 (18,80; 40,60)	2,45 (1,05; 4,22)	0,181
Частота Tconv-клеток с ядерной локализацией FoxP3, % Frequency of Tconv with FoxP3 nuclear localization, %	85,85 (83,00; 90,30)	96,05 (53,80; 98,10)	0,491
Абсолютное содержание Tconv-клеток с ядерной локализацией FoxP3, ×10 <sup>7</sup> /л Absolute counts of Tconv with FoxP3 nuclear localization, ×10 <sup>7</sup> /L	0,93 (0,57; 1,33)	1,27 (0,52; 2,59)	0,491
FoxP3 Bright Detail Intensity в ядре Tconv FoxP3 Bright Detail Intensity in Tconv nucleus	10,04 (4,71; 14,90)	6,06 (4,64; 11,65)	0,029

Показатели углеводного и липидного обменов были сопоставимы в группах пациентов с различным уровнем GS, за исключением содержания ХС-ЛВП, которое было ниже у пациентов с GS > 20 баллов (табл. 3).

В результате корреляционного анализа мы выявили тенденцию к существованию обратной взаимосвязи между количеством Treg-клеток с ядерной локализацией FoxP3 и индексом GS ( $r_s = -0,681$ ) только в группе паци-

ентов с GS > 20 баллов. В общей выборке пациентов со стабильной ИБС индекс GS имел тенденцию к обратной взаимосвязи с интенсивностью флуоресценции FoxP3 в ядрах Treg-лимфоцитов ( $r_s = -0,476$ ) и Tconv-лимфоцитов ( $r_s = -0,526$ ). Количественные и качественные показатели FoxP3+ Treg и FoxP3+ Tconv-лимфоцитов характеризовались наличием многочисленных корреляционных взаимосвязей с параметрами липидного обмена (табл. 4).

**Таблица 3.** Метаболические параметры у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца в зависимости от величины индекса Gensini Score

**Table 3.** Metabolic parameters in patients with chronic CAD depending on the Gensini Score index values

Параметры Parameters	Пациенты с GS < 20 баллов, n = 6 Patients with GS < 20, n = 6	Пациенты с GS ≥ 20 баллов, n = 8 Patients with GS ≥ 20, n = 8	p
Глюкоза, мМ Glucose, mM	5,78 (5,25; 6,00)	6,71 (5,69; 7,36)	0,181
Гликированный гемоглобин, % Glycated hemoglobin, %	6,07 (5,81; 8,40)	6,35 (5,67; 8,28)	0,931
Инсулин, мкМЕ/мл Insulin, μIU/mL	5,91 (5,70; 8,31)	4,19 (3,73; 5,44)	0,177
ОХС, мМ TC, mM	3,10 (2,94; 4,61)	3,73 (3,32; 4,32)	0,491
ТГ, мМ TG, mM	1,05 (0,70; 1,95)	1,52 (1,21; 2,02)	0,345
ХС-ЛВП, мМ HDL-C, mM	1,40 (1,23; 1,68)	1,06 (0,98; 1,23)	0,029
ХС-ЛНП, мМ LDL-C, mM	1,38 (1,06; 2,50)	1,94 (1,58; 2,49)	0,345
ТГ/ХС-ЛВП TG/HDL-C	0,82 (0,56; 1,34)	1,47 (0,96; 1,93)	0,059
ХС-ЛНП/ХС-ЛВП LDL-C/HDL-C	1,10 (0,86; 1,49)	1,88 (1,29; 2,49)	0,108
Аполипопротеин В, мг/дл Apolipoprotein B, mg/dL	63,81 (61,20; 83,25)	91,73 (80,50; 160,85)	0,247
Аполипопротеин А1, мг/дл Apolipoprotein A1, mg/dL	191,03 (177,18; 207,65)	182,03 (142,57; 194,27)	0,329
PCSK-9, нг/мл PCSK-9, ng/mL	188,40 (170,00; 208,20)	233,95 (174,30; 287,50)	0,352
Сортилин, нг/мл Sortilin, ng/mL	10,71 (4,57; 167,23)	59,24 (5,76; 113,54)	0,993

**Таблица 4.** Корреляционные взаимосвязи между метаболическими показателями и параметрами FoxP3+ лимфоцитов

**Table 4.** Correlations between metabolic parameters and parameters of FoxP3+ lymphocytes

Параметры Parameters	$r_s$						
	FoxP3+ Tconv, %	FoxP3+ Treg, ×10 <sup>7</sup> /л (×10 <sup>7</sup> /L)	FoxP3+ Tconv, ×10 <sup>7</sup> /л (×10 <sup>7</sup> /L)	Treg с ядерной локализацией FoxP3, % Treg with nucle- ar FoxP3, %	Treg с ядерной локализацией FoxP3, ×10 <sup>7</sup> /л Treg with nuclear FoxP3, ×10 <sup>7</sup> /L	Tconv с ядерной локализацией FoxP3, ×10 <sup>7</sup> /л Tconv with nuclear FoxP3, ×10 <sup>7</sup> /L	FoxP3 Bright Detail Intensity Treg
ТГ/ХС-ЛВП TG/HDL-C	-	-	-	-	-	-	-0,578
PCSK9 PCSK9	-0,552	-	-0,709	-	-	-0,648	-
Аполипопротеин В Apolipoprotein B	-	0,727	0,573	-	0,709	-	-
Сортилин Sortilin	-0,552	-	-	0,689	-	-	-

## Обсуждение

О важной роли транскрипционного фактора FoxP3 в работе Treg- лимфоцитов и поддержании иммунорегуляторного гомеостаза свидетельствуют тяжелые аутоиммунные патологии, которые развиваются при его мутации [10]. Функциональная активность FoxP3 регулируется на уровне эпигенетических модификаций, транскрипции, взаимодействия с микро-РНК, а также на уровне посттрансляционных процессов, заключающихся в убиквитинировании, ацети-

лировании и фосфорилировании различных аминокислотных остатков FoxP3. Именно изменения на посттрансляционном уровне могут рассматриваться в качестве ключевого фактора, опосредующего изменение субклеточной локализации FoxP3 [10]. Имеются данные о том, что точная локализация внутри ядра также отражает функциональную активность FoxP3: в центре ядра он находится в активированном состоянии, в то время как локализация на периферии ассоциируется с его инактивацией [11].

В нашей работе единственным параметром, отличающимся у пациентов с более выраженным атеросклерозом, была сниженная интенсивность флуоресценции FoxP3 в ядре. Данный феномен косвенно свидетельствует о меньшем содержании транскрипционного фактора FoxP3 в ядре каждой отдельной клетки. Причем мы выявили изменения именно в ядрах конвенционных FoxP3 T-лимфоцитов. Сведений о содержании и эффектах FoxP3+ Tconv-лимфоцитов при атеросклерозе в доступной литературе мы не обнаружили, тогда как широко обсуждается высокая пластичность Treg клеток, которые способны терять иммуносупрессорные свойства и трансформироваться в провоспалительные T-лимфоциты под влиянием IL-6 и IL-1 $\beta$ -опосредованного сигналинга [10]. Вероятно, хроническое воспаление при атеросклерозе ассоциируется со сниженной экспрессией и повышенной деградацией FoxP3 в Treg-лимфоцитах [12].

Исходя из полученных нами данных корреляционно-го анализа, наиболее перспективными модуляторами активности FoxP3+ клеток можно рассматривать соотношение ТГ/ХС-ЛВП, апо-В, PCSK9 и сортилин. Нарушения липидного спектра являются критическими для поддержания жизнеспособности Treg-лимфоцитов. Так, С.М. Rueda и соавт. (2017) установили, что ЛВП выступают в роли антиапоптотического фактора Treg, в то время как на наивные CD4+ лимфоциты и T-клетки памяти ЛВП не влияют [6]. Снижение внутриклеточного транспорта триглицеридов в Treg-лимфоциты, напротив, оказывает положительное влияние на рекрутинг и аккумуляцию этих клеток в очагах хронического воспаления [13].

Мы выявили прямую взаимосвязь между содержанием апо-В и абсолютным количеством регуляторных и конвенционных FoxP3+ T-лимфоцитов. Апо-В является одним из доказанных эпитопов, вызывающих активацию T-клеток в ходе атерогенеза. Наличие в пуле T-лимфоцитов апо-В-специфичных эффекторных клеток свойственно для пациентов с атеросклеротическим поражением сосудов, в то время как у здоровых людей выявляются исключительно апо-В-специфичные Treg [14].

PCSK9 способна оказывать провоспалительные эффекты не только за счет увеличения содержания холестерина, но и за счет прямого взаимодействия с клет-

ками иммунной системы. *In vitro* PCSK9 увеличивала продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами и синовиоцитами. Пациенты с ремиссией ревматоидного артрита характеризовались меньшим содержанием сывороточной PCSK9 по сравнению с пациентами, у которых ремиссия не была достигнута [15]. Согласно нашим данным, PCSK9 также может вносить вклад в поляризацию Treg в сторону конвенционных лимфоцитов, поскольку ее уровень в сыворотке отрицательно коррелировал с количеством FoxP3+ Tconv-лимфоцитов и уровнем в них ядерной локализации FoxP3.

Сортилин вовлечен в секрецию PCSK9 [16]. В то же время деплеция Treg-лимфоцитов ассоциировалась со снижением продукции сортилина в печени [13]. Несмотря на то, что наши данные и результаты, полученные другими исследователями, однозначно свидетельствуют о вовлеченности сортилина в регуляцию метаболизма и воспаления, требуются дальнейшие исследования для выяснения его непосредственной роли в этих процессах. Кроме того, сведения о вкладе сортилина в формирование атеросклеротической бляшки также являются противоречивыми [14]. Среди пациентов, включенных в наше исследование, уровни сортилина характеризовались высокой вариабельностью и не зависели от тяжести атеросклеротического поражения коронарных артерий.

## Заключение

Таким образом, интенсивность флуоресценции FoxP3 в ядре T-конвенционных лимфоцитов является более чувствительным маркером иммунорегуляторного дисбаланса при хронической ИБС по сравнению с количественным содержанием FoxP3+ T-клеток в циркулирующей крови, которое остается практически неизменным по мере нарастания выраженности атеросклероза. При этом маркеры метаболизма липидов находятся в тесной взаимосвязи как с количественными, так и с качественными параметрами FoxP3+ T-лимфоцитов. Целесообразно применение методов углубленного молекулярно-генетического анализа для изучения транскрипционных характеристик транскрипционного фактора FoxP3 при атеросклерозе.

## Литература / References

- Dietel B., Cicha I., Voskens C.J., Verhoeven E., Achenbach S., Garlachs C.D. De-creased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells. *Atherosclerosis*. 2013;230(1):92–99. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.06.014.
- Sharma M., Schlegel M.P., Afonso M.S., Brown E.J., Rahman K., Weinstein A. et al. Regulatory T cells license macrophage pro-resolving functions during atherosclerosis regression. *Circ. Res*. 2020;127(3):335–353. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316461.
- Magg T., Mannert J., Ellwart J.W., Schmid I., Albert M.H. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur. J. Immunol*. 2012;42(6):1627–1638. DOI: 10.1002/eji.201141838.
- Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Винницкая И.В., Кошельская О.А., Бощенко А.А., Трубачева О.А. Иммунорегуляторный дисбаланс и структурно-функциональное состояние сердца у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. *Медицинская иммунология*. 2018;20(6):833–846. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-833-846.
- Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Винницкая И.В., Кошельская О.А., Бощенко А.А., Трубачева О.А. Immunoregulatory imbalance and functional state of the heart in patients with diabetes mellitus type 2. *Medical Immunology (Russia)*. 2018;20(6):833–846 (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-833-846.
- Lin Y.Z., Lu S.H., Lu Z.D., Huang Y., Shi Y., Liu L. et al. Downregulation of CD4+LAP+ and CD4+CD25+ regulatory T cells in acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:764082. DOI: 10.1155/2013/764082.
- Rueda C.M., Rodríguez-Perea A.L., Moreno-Fernandez M., Jackson C.M., Melchior J.T., Davidson W.S. et al. High density lipoproteins selectively promote the survival of human regulatory T cells. *J. Lipid. Res*. 2017;58(8):1514–1523. DOI: 10.1194/jlr.M072835.
- Frostegård J., Ahmed S., Hafström I., Ajeganova S., Rahman M. Low levels of PCSK9 are associated with remission in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF- $\alpha$ : potential underlying mechanisms. *Arthritis Res. Ther*. 2021;23(1):32. DOI: 10.1186/s13075-020-02386-7.
- Gustafsen C., Kjolby M., Nyegaard M., Mattheisen M., Lundhede J., Butenschøn H. et al. The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. *Cell Metab*. 2014;19(2):310–318. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.12.006.
- Gensini G.G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am. J. Cardiol*. 1983;51(3):606. DOI: 10.1016/S0002-9149(83)80105-2.
- Colamatteo A., Carbone F., Bruzzaniti S., Galgani M., Fusco C., Maniscalco G.T. et al. Molecular mechanisms controlling Foxp3 expression in health and autoimmunity: from epigenetics to post-translational regulation. *Front. Immunol*. 2020;10:3136. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03136.

11. Kwon H.K., Chen H.M., Mathis D., Benoist C. Different molecular complexes that mediate transcriptional induction and repression by FoxP3. *Nat. Immunol.* 2017;18(11):1238–1248. DOI: 10.1038/ni.3835.
12. Hwang S.M., Sharma G., Verma R., Byun S., Rudra D., Im S.H. Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):4736. DOI: 10.1038/s41467-018-07254-2.
13. Rodia C.N., Li D., Tambini N.S., Johnson Z.K., Jellison E.R., Vella A.T. et al. ApoC-III overexpression and LDLR<sup>-/-</sup> protect mice from DSS-colitis: Identifying a new role for lipoprotein metabolism in Tregs. *bioRxiv.* 2019;823690. DOI: 10.1101/823690.
14. Kimura T., Kobiyama K., Winkels H., Tse K., Miller J., Vassallo M. et al. Regulatory CD4<sup>+</sup> T cells recognize major histocompatibility complex class II molecule-restricted peptide epitopes of apolipoprotein B. *Circulation.* 2018;138(11):1130–1143. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031420.
15. Klingenberg R., Gerdes N., Badeau R.M., Gisterá A., Strothoff D., Ketelhuth D.F. et al. Depletion of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2013;123(3):1323–1334. DOI: 10.1172/JCI63891.
16. Goettsch C., Kjolby M., Aikawa E. Sortilin and its multiple roles in cardiovascular and metabolic diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018;38(1):19–25. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310292.

## Информация о вкладе авторов

Кологривова И.В. предложила концепцию исследования, разработала его протокол, проводила проточную цитометрию с визуализацией, анализировала и интерпретировала данные, написала первую версию рукописи.

Суслова Т.Е. предложила концепцию исследования, разработала его протокол, внесла вклад в доработку исходного варианта рукописи.

Кошельская О.А. организовала обследование пациентов и взятие крови, внесла вклад в доработку исходного варианта рукописи.

Харитоновна О.А. организовала обследование пациентов и взятие крови.

Трубачева О.А. проводила проточную цитометрию с визуализацией. Кравченко Е.С. выполняла иммуноферментный анализ.

Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ругаясь за их точность и безупречность.

## Сведения об авторах

**Кологривова Ирина Вячеславовна**, канд. мед. наук, научный сотрудник, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-4537-0008.

E-mail: [ikologrivova@gmail.com](mailto:ikologrivova@gmail.com).

**Суслова Татьяна Евгеньевна**, канд. мед. наук, заведующий отделением клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9645-6720.

E-mail: [tes@cardio-tomsk.ru](mailto:tes@cardio-tomsk.ru).

**Кошельская Ольга Анатольевна**, д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник, отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-6679-1269.

E-mail: [koshel@live.ru](mailto:koshel@live.ru).

**Харитоновна Ольга Анатольевна**, младший научный сотрудник, отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-2818-5882.

E-mail: [hoa@cardio-tomsk.ru](mailto:hoa@cardio-tomsk.ru).

**Трубачева Оксана Александровна**, канд. мед. наук, научный сотрудник, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-1253-3352.

E-mail: [otrubacheva@inbox.ru](mailto:otrubacheva@inbox.ru).

**Кравченко Елена Сергеевна**, младший научный сотрудник, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-1235-9956.

E-mail: [nikonovaes@gmail.com](mailto:nikonovaes@gmail.com).

 **Кологривова Ирина Вячеславовна**, e-mail: [ikologrivova@gmail.com](mailto:ikologrivova@gmail.com).

## Information on author contributions

Kologrivova I.V. suggested a conception of study and elaborated its protocol, performed imaging flow cytometry, analyzed and interpreted data, created the initial version of the manuscript.

Suslova T.E. suggested a conception of study and elaborated its protocol, edited the initial version of the manuscript.

Koshelskaya O.A. organized patients' examination and blood collection, edited the initial version of the manuscript.

Kharitonova O.A. organized patient examinations and blood collection.

Trubacheva O.A. performed imaging flow cytometry.

Kravchenko E.S. performed enzyme-linked immunosorbent assay.

All the authors approved the submission of the manuscript and agreed to be responsible for all the aspects of the work, guarantee their accuracy and impeccability.

## Information about the authors

**Irina V. Kologrivova**, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-4537-0008.

E-mail: [ikologrivova@gmail.com](mailto:ikologrivova@gmail.com).

**Tatiana E. Suslova**, Cand. Sci. (Med.), Head of Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-9645-6720.

E-mail: [tes@cardio-tomsk.ru](mailto:tes@cardio-tomsk.ru).

**Olga A. Koshelskaya**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Research Scientist, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences ORCID 0000-0002-6679-1269.

E-mail: [koshel@live.ru](mailto:koshel@live.ru).

**Olga A. Kharitonova**, Junior Research Scientist, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences ORCID 0000-0002-2818-5882.

E-mail: [hoa@cardio-tomsk.ru](mailto:hoa@cardio-tomsk.ru).

**Oksana A. Trubacheva**, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-1253-3352.

E-mail: [otrubacheva@inbox.ru](mailto:otrubacheva@inbox.ru).

**Elena S. Kravchenko**, Junior Research Scientist, Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-1235-9956.

E-mail: [nikonovaes@gmail.com](mailto:nikonovaes@gmail.com).

 **Irina V. Kologrivova**, e-mail: [ikologrivova@gmail.com](mailto:ikologrivova@gmail.com).

Received March 22, 2021

Поступила 22.03.2021