

ПАЦИЕНТЫ С КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ ИМЕЛИ ИЗМЕНЕННОЕ СООТНОШЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ В КРОВИ, КОТОРОЕ БЫЛО СВЯЗАНО С ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИЕЙ КЛЕТОК

Верхова С.С.^{1, 2}, Никифоров Н.Г.^{1, 3}, Чегодаев Е.С.^{1, 4}, Попов М.А.⁵

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцина ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

³ Центр коллективного пользования и Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

⁵ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Резюме. Коронарный атеросклероз (CAD) является одной из ведущих причин смертности в развитых странах. Экспериментальные данные подтверждают роль моноцитов в развитии CAD. Известны три основные субпопуляции циркулирующих моноцитов крови: классические CD14⁺CD16⁻ (~80%), промежуточные CD14⁺CD16⁺ (~5%) и неклассические CD14⁺CD16⁺⁺ (~15%). Считается, что каждая из субпопуляций моноцитов выполняет разные функции. Есть исследования, которые демонстрируют, что классические моноциты отвечают в большей степени на бактериальное присутствие, тогда как неклассические на вирусное. Однако функции субпопуляций моноцитов до конца не изучены. Ранее мы продемонстрировали, что циркулирующие моноциты крови пациентов с атеросклерозом имели повышенную провоспалительную активность. Мы решили выяснить, как связано соотношение субпопуляций моноцитов в крови и воспалительная реакция клеток при атеросклерозе. Целью нашей работы стало исследовать связь воспалительного ответа первичных моноцитов с распределением субпопуляций моноцитов относительно общего пула моноцитов у здоровых и больных CAD. В исследование было включено 20 мужчин в возрасте от 46 до 70 лет, 10 из них без CAD и 10 пациентов с CAD.

Адрес для переписки:

Верхова Светлана Сергеевна
ГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»
125315, Россия, Балтийская ул., 8
Тел.: 8 (926) 673-39-16.
E-mail: verkhova.svetlana@gmail.com

Address for correspondence:

Svetlana S. Verkhova
Institute of General Pathology and Pathophysiology
8 Baltiyskaya St
Moscow
125315 Russian Federation
Phone: +7 (926) 673-39-16.
E-mail: verkhova.svetlana@gmail.com

Образец цитирования:

С.С. Верхова, Н.Г. Никифоров, Е.С. Чегодаев, М.А. Попов «Пациенты с коронарным атеросклерозом имели измененное соотношение субпопуляций моноцитов в крови, которое было связано с воспалительной реакцией клеток» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 4. С. 893-898. doi: 10.46235/1028-7221-16857-PWC

© Верхова С.С. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.S. Verkhova, N.G. Nikiforov, E.S. Chegodaev, M.A. Popov “Patients with coronary atherosclerosis had an altered ratio of monocyte subpopulations in the blood, which was associated with an inflammatory cell response”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 4, pp. 893-898. doi: 10.46235/1028-7221-16857-PWC

© Verkhova S.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16857-PWC

Была произведена коронарография по результатам которой пациенты были разделены на больных коронарным атеросклерозом с выявленным стенозом в 2 и более артериях (CAD) и здоровых без стеноза в артериях. Далее производился забор крови для изучения циркулирующих моноцитов. Субпопуляции моноцитов были выявлены при помощи проточной цитометрии из лейкоцитарной фракции с использованием антител против CD14-FITC и CD16-PB450-A. Сразу после выделения моноциты стимулировали LPS с конечной концентрацией 1 мкг/мл, через 24 часа отбирали супернатант для дальнейшего иммуноферментного анализа. Воспалительный ответ оценивали по секреции цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 с помощью ELISA. Моноциты пациентов с CAD обладали измененной воспалительной реакцией в ответ на стимуляцию LPS по сравнению с пациентами без CAD. Это проявлялось в повышенной секреции IL-1 β и TNF, и пониженной секрецией CCL2 и IL-6. Повышение количества промежуточных и неклассических моноцитов у пациентов с CAD было связано с изменениями в воспалительном ответе клеток по секреции цитокинов IL-1 β и CCL2. Можно предположить, что патологические изменения в представленности субпопуляций моноцитов в кровотоке может быть одной из причин хронизации воспаления в стенках артерий, способствуя прогрессии атеросклеротических поражений.

Ключевые слова: коронарный атеросклероз, субпопуляции моноцитов, CD14⁺CD16⁺, CD14⁺CD16⁺⁺, воспалительный ответ, LPS, IL-1 β , CCL2

PATIENTS WITH CORONARY ATHEROSCLEROSIS HAD AN ALTERED RATIO OF MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE BLOOD, WHICH WAS ASSOCIATED WITH AN INFLAMMATORY CELL RESPONSE

Verkhova S.S.^{a, b}, Nikiforov N.G.^{a, c}, Chegodaev E.S.^{a, d}, Popov M.A.^e

^a Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

^b Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

^c Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^e Vladimirskiy Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Coronary artery disease (CAD) is one of the leading causes of death in developed countries. Experimental data confirm the role of monocytes in the development of CAD. Three main subpopulations of circulating blood monocytes are known: classical CD14⁺⁺CD16⁻ (~80%), intermediate CD14⁺CD16⁺ (~5%) and non-classical CD14⁺CD16⁺⁺ (~15%). It is believed that each of the subpopulations of monocytes performs different functions. There are studies that demonstrate that classical monocytes respond more to the bacterial presence, whereas non-classical ones respond to the viral one. However, the functions of monocyte subpopulations have not been fully studied. Previously, we demonstrated that circulating monocytes of the blood of patients with atherosclerosis had increased proinflammatory activity. We decided to find out how the ratio of monocyte subpopulations in the blood is related to the inflammatory response of cells in atherosclerosis. The aim of our work was to investigate the relationship of the inflammatory response of primary monocytes with the distribution of monocyte subpopulations relative to the total pool of monocytes in healthy and sick CAD. The study included 20 men aged 46 to 70 years, 10 of them without CAD and 10 patients with CAD. A coronary angiography was performed, according to the results of which the patients were divided into patients with coronary atherosclerosis with detected stenosis in 2 or more arteries (CAD) and healthy ones without stenosis in the arteries. Next, blood was taken to study circulating monocytes. Monocyte subpopulations were detected by flow cytometry from the leukocyte fraction using antibodies against CD14-FITC and CD16-PB450-A. Immediately after isolation, monocytes were stimulated with LPS with a final concentration of 1 μ g/mL, and a supernatant was selected 24 hours later for further enzyme immunoassay. The inflammatory response was

assessed by the secretion of cytokines TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and CCL2 using ELISA. The monocytes of CAD patients had an altered inflammatory response in response to LPS stimulation compared to patients without CAD. This was manifested in increased secretion of IL-1 β and TNF, and decreased secretion of CCL2 and IL-6. An increase in the number of intermediate and non-classical monocytes in patients with CAD was associated with changes in the inflammatory response of cells to the secretion of cytokines IL-1 β and CCL2. It can be assumed that pathological changes in the representation of monocyte subpopulations in the bloodstream may be one of the causes of chronic inflammation in the walls of the arteries, contributing to the progression of atherosclerotic lesions.

Keywords: coronary atherosclerosis, monocyte subpopulations, CD14⁺CD16⁺, CD14⁺CD16⁺⁺, inflammatory response, LPS, IL-1 β , CCL2

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00273.

Введение

Моноциты являются ключевыми клетками врожденного иммунитета. Известны три основные субпопуляции циркулирующих моноцитов крови: классические CD14⁺⁺CD16⁻ (~80%), промежуточные CD14⁺CD16⁺ (~5%) и неклассические CD14⁺CD16⁺⁺ (~15%) [5]. Считается, что каждая из субпопуляций моноцитов выполняет разные функции [1, 2]. Есть исследования, которые демонстрируют, что классические моноциты отвечают в большей степени на бактериальное присутствие, тогда как неклассические – на вирусное [1]. Однако функции субпопуляций моноцитов до конца не изучены. Ранее мы продемонстрировали, что циркулирующие моноциты крови пациентов с атеросклерозом имели повышенную провоспалительную активность [3]. Мы решили выяснить, как связано соотношение субпопуляций моноцитов в крови и воспалительная реакция клеток при атеросклерозе. **Целью нашей работы** стало исследовать связь воспалительного ответа первичных моноцитов с распределением субпопуляций моноцитов относительно общего пула моноцитов у здоровых и больных САД.

Материалы и методы

В исследование было включено 20 мужчин в возрасте от 46 до 70 лет, 10 из них без коронарного атеросклероза (САД) и 10 пациентов с САД. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, все пациенты предоставили письменное информированное согласие. Пациенты были приняты в кардиохирургическое отделение МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского. Была произведена коронарография по результатам которой пациенты были разделены на больных коронарным атеросклерозом с выявленным стенозом в 2 и более артериях (САД) и здоровых без стеноза в артериях. Далее производился забор крови для изучения циркулирующих

моноцитов. Лейкоцитарную фракцию получали путем наслаивания на фикал и центрифугирования. Затем выделяли первичные моноциты с помощью магнитной сепарации положительной по CD14⁺. Субпопуляции моноцитов были выявлены при помощи проточной цитометрии (производитель Beckman Coulter, США) из лейкоцитарной фракции с использованием антител против CD14-FITC и CD16-PB450-A (производитель Miltenyi Biotec, Германия). Первичные моноциты культивировали в 48-луночном культуральном планшете (производитель SPL Lifesciences, Южная Корея) в среде X-VIVO 10 (производитель Lonza Bioscience, США) сразу после выделения стимулировали LPS с конечной концентрацией 1 мкг/мл, через 24 часа отбирали супернатант для дальнейшего иммуноферментного анализа. Воспалительный ответ оценивали по секреции цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 с помощью ELISA (производитель R&D Systems, США).

Результаты и обсуждение

Оказалось, что моноциты пациентов с САД секретировали повышенный уровень IL-1 β и TNF, но пониженный уровень CCL2 и IL-6 при стимуляции LPS по сравнению пациентов без САД (рис. 1).

У пациентов с САД наблюдалось повышенное содержание промежуточных и неклассических субпопуляций моноцитов, и сниженное количество классических моноцитов по сравнению пациентами без САД (рис. 2А).

Также у пациентов с САД наблюдалась прямая корреляция как между неклассической, так и промежуточной субпопуляцией моноцитов и секрецией IL-1 β , и обратная с секрецией IL-10 и CCL2 после стимуляции LPS. Так как базальная секреция цитокинов была на уровне чувствительности метода, то различия в таких значениях не приводили (рис. 2Б).

Таким образом, наблюдаемое повышение количества промежуточных и неклассических моноцитов у пациентов с САД было связано с

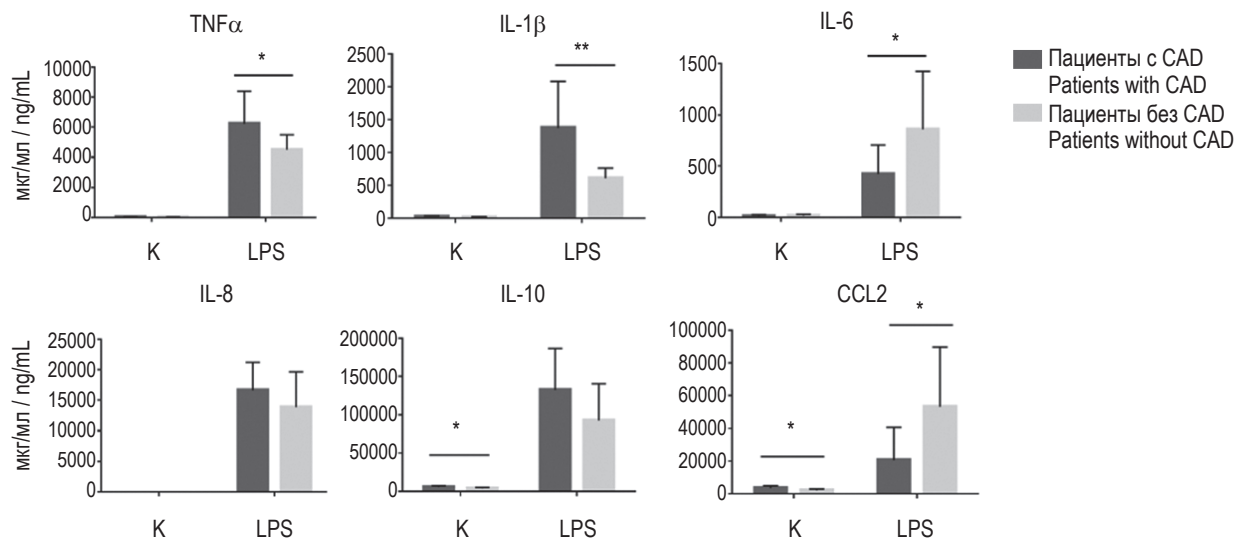


Рисунок 1. Секретия цитокинов стимулированными LPS первичными моноцитами пациентов с CAD

Примечание. Представлен воспалительный ответ первичных моноцитов по цитокинам TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 после стимуляции LPS (1 мкг/мл) через 24 часа. По оси X – моноциты с базальной (K) и стимулированной липополисахаридом (LPS) секретией от здоровых и больных CAD соответственно. По оси Y – уровень секреции соответствующих цитокинов в пг/мл. * – по критерию Стьюдента $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Figure 1. Cytokine secretion by LPS-stimulated primary monocytes from CAD patients

Note. The inflammatory response of primary monocytes according to the cytokines TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 after stimulation with LPS (1 μ g/mL) after 24 hours is presented. X-axis shows monocytes with basal (K) and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated secretion from healthy and CAD patients, respectively. The Y axis is the level of secretion of the corresponding cytokines in pg/mL. *, by Student's t-test $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

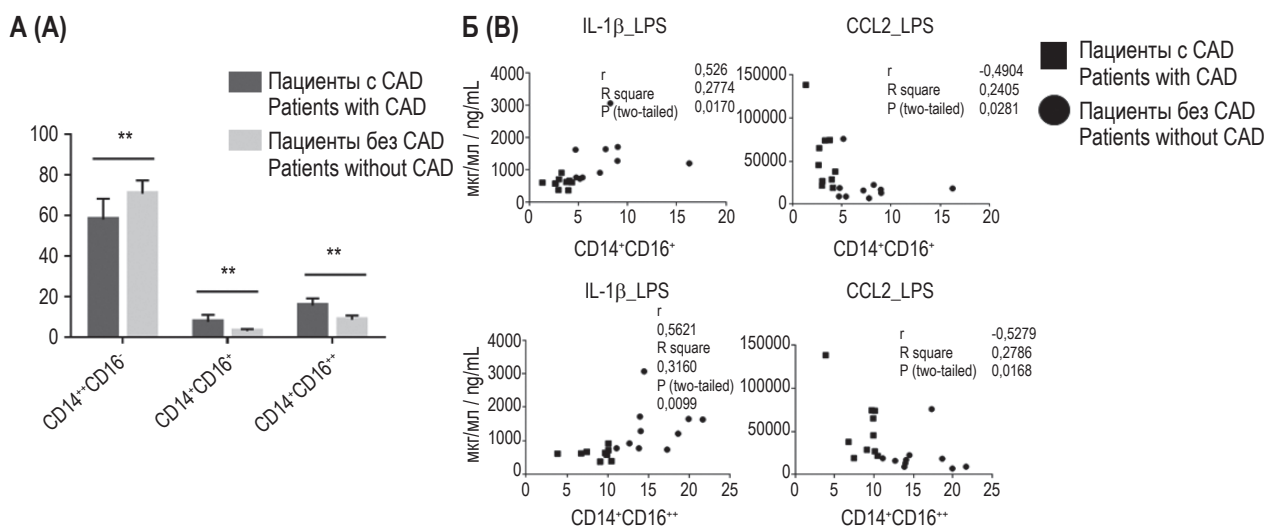


Рисунок 2. Взаимосвязь субпопуляций и воспалительного ответа первичных моноцитов у пациентов с CAD

Примечание. А – процентное соотношение субпопуляций от общего моноцитарного пула у пациентов с CAD и без соответственно. По оси X – субпопуляции моноцитов (классические CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$, промежуточные CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ и неклассические CD14 $^{++}$ CD16 $^{++}$). По оси Y – процент субпопуляций от общего моноцитарного пула. ** – по критерию Стьюдента $p < 0,01$. Б – взаимосвязь субпопуляций моноцитов с воспалительным ответом пациентов с CAD и без соответственно. По оси X – процент промежуточных CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ и неклассических CD14 $^{++}$ CD16 $^{++}$ субпопуляций моноцитов от общего моноцитарного пула. По оси Y – уровень секреции цитокина IL-1 β и хемокина CCL2 после стимуляции LPS (1 мкг/мл) в пг/мл. По критерию Пирсона на уровне $p < 0,05$.

Figure 2. Relationship between subpopulations and the inflammatory response of primary monocytes in patients with CAD

Note. A, percentage of subpopulations of the total monocytic pool in patients with and without CAD, respectively. Along the X axis are monocyte subpopulations (classical CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$, intermediate CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ and non-classical CD14 $^{++}$ CD16 $^{++}$). The Y axis is the percentage of subpopulations from the total monocytic pool. **, Student's t-test $p < 0.01$. B, relationship of monocyte subpopulations with the inflammatory response of patients with and without CAD, respectively. The X axis is the percentage of intermediate CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ and non-classical CD14 $^{++}$ CD16 $^{++}$ subpopulations of monocytes from the total monocytic pool. The Y axis shows the level of secretion of the cytokine IL-1 β and chemokine CCL2 after stimulation with LPS (1 μ g/mL) in pg/mL. By Pearson t-test at $p < 0.05$ level.

изменениями в воспалительном ответе клеток по секреции цитокинов IL-1 β и CCL2. При этом изменения в секреции TNF и IL-6 моноцитами пациентов с САД не были связаны с субпопуляциями клеток.

Заключение

Моноциты пациентов с САД обладали измененной воспалительной реакцией в ответ на стимуляцию LPS по сравнению с пациентами без САД. Это проявлялось в повышенной секреции IL-1 β и TNF, и пониженной секрецией CCL2 и IL-6. Повышение количества промежуточных и неклассических моноцитов у пациентов с САД

было связано с изменениями в воспалительном ответе клеток по секреции цитокинов IL-1 β и CCL2. Можно предположить, что патологические изменения в представленности субпопуляций моноцитов в кровотоке может быть одной из причин хронизации воспаления в стенках артерий, способствуя прогрессии атеросклеротических поражений.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН за возможность использования научного оборудования.

Список литературы / References

1. Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cumano A., Lauvau G., Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 2007, Vol. 317, no. 5838, pp. 666-670.
2. Cros J., Cagnard N., Woollard K., Patey N., Zhang S.Y., Senechal B., Puel A., Biswas S.K., Moshous D., Picard C., Jais J.P., D'Cruz D., Casanova J.L., Trouillet C., Geissmann F. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, 2010, Vol. 33, no. 3, pp. 375-386.
3. Ghattas A., Griffiths H.R., Devitt A., Lip G.Y., Shantsila E. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2013, Vol. 62, no. 17, pp. 1541-1551.
4. Nikiforov N.G., Kirichenko T.V., Kubekina M.V., Chegodaev Y.S., Zhuravlev A.D., Ilchuk L.A., Nikolaeva M.A., Arefieva A.S., Popov M.A., Verkhova S.S., Bagheri E.M., Orekhov A.N. Macrophages derived from LPS-stimulated monocytes from individuals with subclinical atherosclerosis were characterized by increased pro-inflammatory activity. *Cytokine*, 2023, Vol. 172, 156411. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156411.
5. Passlick B., Flieger D., Ziegler-Heitbrock H.W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 1989, Vol. 74, no. 7, pp. 2527-2534.
6. Patel A.A., Zhang Y., Fullerton J.N., Boelen L., Rongvaux A., Maini A.A., Bigley V., Flavell R.A., Gilroy D.W., Asquith B., Macallan D., Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.*, 2017, Vol. 214, no. 7, pp. 1913-1923.

Авторы:

Верхова С.С. – аспирант Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; старший лаборант лаборатории Ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Никифоров Н.Г. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; младший научный сотрудник, Центр коллективного пользования и Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБНУ «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Verkhova S.S., Postgraduate Student, Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery; Senior Assistant, Angiopathology Laboratory, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Nikiforov N.G., PhD (Biology), Research Associate, Angiopathology laboratory, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Junior Research Associate, Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Чегодаев Е.С. – аспирант ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; старший лаборант лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Попов М.А. – к.м.н., научный сотрудник кардиохирургического отделения ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Chegodaev E.S., Postgraduate Student, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Assistant, Angiopathology Laboratory, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Popov M.A., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Cardiac Surgery, Vladimirskiy Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 25.04.2024

Received 01.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 25.04.2024