

**ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НК- И НКТ-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ
С СУБКЛИНИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

В.В. Генкель, И.И. Долгушин, И.Л. Батурина, И.В. Емельянов, А.Ю. Савочкина, И.И. Шапошник

*ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64*

Роль НК-клеток в атерогенезе до настоящего времени точно не установлена. Предполагается, что НК-клетки могут участвовать в формировании и прогрессировании атеромы путем распознавания липидов и продукции интерферона- γ , перфорина и гранзима Б. **Цель исследования** – изучить особенности субпопуляционного состава НК- и НКТ-клеток и их диагностическую ценность у пациентов среднего возраста в зависимости от наличия субклинического атеросклероза артерий нижних конечностей. **Материал и методы.** В исследование включены 80 человек (44 мужчины (55 %) и 36 женщин (45 %)), возраст которых составлял 49 (44,0; 56,0) лет. Всем пациентам проводили дуплексное ультразвуковое сканирование (ДУС) артерий нижних конечностей. Иммунофенотипирование лимфоцитов выполняли на проточном цитометре Navios 6/2 (Beckman Coulter, США) с использованием меченых мышиных антител: CD45-PC7.0, CD16-PE, CD11b-FITC, CD4-APC, CD8-PC5.5, CD3-ECD производства компании Beckman Coulter, США. **Результаты.** По результатам ДУС артерий нижних конечностей пациенты разделены на две группы: в первую группу включены 46 (57,5 %) пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, во вторую – 34 (42,5 %) пациента без атеросклеротических бляшек в артериях нижних конечностей и с лодыжечно-плечевым индексом $\geq 0,9$. У больных первой группы в крови было статистически значимо больше, чем у лиц второй группы, циркулирующих НК-клеток (152 (102; 203) кл/мкл против 118 (80,0; 146) кл/мкл; $p = 0,048$) и меньше НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток (3,00 (0,00; 15,0) кл/мкл против 25,0 (5,00; 72,0) кл/мкл; $p = 0,035$). Снижение количества НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток $\leq 16,5$ кл/мкл позволяло диагностировать атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей с чувствительностью 80,0 % и специфичностью 58,8 %. По данным логистического регрессионного анализа уменьшение их содержания $\leq 16,5$ кл/мкл ассоциировалось с отношением шансов поражения артерий нижних конечностей 5,71 (95%-й доверительный интервал 1,44–22,6; $p = 0,013$). **Заключение.** Пациенты с атеросклерозом артерий нижних конечностей отличались статистически значимо большим, чем у лиц группы сравнения, количеством циркулирующих НК-клеток и меньшим – НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток. Снижение содержания последних $\leq 16,5$ кл/мкл позволяло диагностировать атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей с чувствительностью 80,0 % и специфичностью 58,8 %.

Ключевые слова: атеросклероз, артерии нижних конечностей, НК-клетки, НКТ-клетки.

Генкель Вадим Викторович – канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, ORCID: 0000-0001-5902-3803, e-mail: henkel-07@mail.ru

Долгушин Илья Ильич – д-р мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, президент ФГБОУ ВО ЮУГМУ МЗ РФ, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, директор НИИ иммунологии, ORCID: 0000-0002-0901-8042, e-mail: dol-ii@mail.ru

Батурина Ирина Леонидовна – канд. мед. наук, с.н.с. НИИ иммунологии, ORCID: 0000-0002-5960-4189, e-mail: irisha_baturina@mail.ru

Емельянов Илья Владимирович – старший лаборант НИИ иммунологии, ORCID: 0000-0003-0425-4596, e-mail: set2480@mail.ru

Савочкина Альбина Юрьевна – д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, г.н.с. НИИ иммунологии, ORCID: 0000-0002-0536-0924, e-mail: alina7423@mail.ru

Шапошник Игорь Иосифович – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней, ORCID: 0000-0002-7731-7730, e-mail: shaposhnik@ya.ru

В патогенезе атеросклероза и связанных с ним сердечно-сосудистых заболеваний важнейшую роль играет как врожденный, так и адаптивный иммунитет [1]. Естественные киллеры (natural killer, NK) и NKT-лимфоциты (natural killer T lymphocyte), взаимодействуя с антиген-презентирующими клетками, обеспечивают кооперацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета, а также регулируют иммунный ответ [2]. Важная роль NK- и NKT-клеток в поддержании иммунного гомеостаза отражается в их участии в развитии аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний (ХВЗ) [3]. Открытие способности NKT-клеток распознавать липиды привело к активному изучению роли NK- и NKT-клеток в атерогенезе [4].

В ранних исследованиях показано увеличение числа циркулирующих NK-клеток у пациентов с тяжелым атеросклерозом [5]. В исследовании I. Bonaccorsi et al. установлено, что у лиц с симптомным атеросклерозом сонных артерий увеличено количество NK-клеток в каротидных атеромах [6]. Кроме того, NK-клетки, выделенные из атером симптомных пациентов, демонстрировали более выраженную продукцию интерферона- γ . Однако значение NK- и NKT-клеток в атерогенезе продолжает изучаться, что связано с большим количеством нерешенных вопросов [7]. Крайне ограничены данные о возможной диагностической ценности различных субпопуляций циркулирующих NK- и NKT-клеток при субклиническом атеросклерозе различной локализации.

Цель исследования – изучить особенности субпопуляционного состава NK- и NKT-клеток, а также их диагностическую ценность у пациентов среднего возраста в зависимости от наличия субклинического атеросклероза артерий нижних конечностей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включали лиц в возрасте 40–64 лет без установленных атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), прошедших по направлению лечащего врача с целью уточнения кардиоваскулярного риска (КВР) дуплексное ультразвуковое сканирование (ДУС) артерий нижних конечностей. Необходимым условием включения пациентов в исследование было подписанное информированное согласие. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол № 10 от 27.10.2018). Исследование выполнено при финансовой под-

держке ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России в рамках выполнения комплексной научной темы «Клинико-диагностические и профилактические аспекты сочетанных заболеваний внутренних органов у населения Южного Урала».

Критериями невключения в исследование и/или исключения из него являлись следующие клинические состояния: установленные ранее атеросклеротические ССЗ (цереброваскулярная болезнь в анамнезе, ишемическая болезнь сердца, заболевание периферических артерий, реваскуляризация коронарных или периферических артерий), тяжелые нарушения функции печени и почек (снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) менее 30 мл/мин/1,73 м²), злокачественные новообразования, установленные хронические воспалительные заболевания, острые воспалительные или инфекционные заболевания в предшествующие 28 дней.

Ультразвуковое исследование. Всем пациентам проводили ДУС артерий нижних конечностей. Исследование выполняли в В-режиме, режиме цветового картирования, импульсной доплерографии, энергетической доплерографии. Осматривали с обеих сторон в продольном и поперечном сечении на всем протяжении общие бедренные артерии (ОБА), поверхностные бедренные артерии (ПБА), подколенные артерии (ПКА), тибеоперонеальный ствол, передние большеберцовые артерии (ПББА), задние большеберцовые артерии (ЗББА).

Атеросклеротической бляшкой (АСБ) считали фокальное увеличение толщины комплекса интима-медия (ТКИМ) более 1,5 мм, либо на 0,5 мм больше окружающей ТКИМ, либо на 50 % больше ТКИМ прилежащих участков сосуда [8]. Выраженность стенозирования измеряли планиметрически в В-режиме по диаметру согласно методу ECST (The European Carotid Surgery Trial) [9]. Исследование проводили линейным датчиком с частотой 10 МГц на цифровом ультразвуковом многофункциональном диагностическом сканере Samsung Medison ЕКО7 (Республика Корея).

Лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) артериального давления (АД) измеряли после периода покоя не менее 5 минут. Систолическое АД измеряли в доплерографическом режиме, используя линейный датчик цифрового ультразвукового многофункционального диагностического сканера Samsung Medison ЕКО7 (Республика Корея). Последовательно измеряли АД на правом плече, на правой нижней конечности, располагая датчик сначала над ЗББА, затем над артерией тыла стопы. В таком же порядке определяли АД на левой руке и левой нижней конечности. За си-

столическое АД на нижней конечности принимали большее из двух полученных значений на артерии тыла стопы или ЗББА. При проведении измерения и интерпретации результатов руководствовались научным докладом Американской ассоциации сердца и клиническими рекомендациями Европейского общества кардиологов по ведению пациентов с поражением периферических артерий 2017 года [10, 11].

Лабораторное исследование. В сыворотке крови определяли содержание общего холестерина (ОХС), ХС липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и высокой (ХС ЛПВП) плотности, триглицеридов (ТГ), гликированного гемоглобина (HbA1c), глюкозы венозной крови, креатинина (с последующим расчетом СКФ по формуле СКД-ЕРІ).

Имунофенотипирование лимфоцитов выполняли на проточном цитометре Navios 6/2 (Beckman Coulter, США) с использованием меченых мышинных антител: CD45-PC7.0, CD16-PE, CD11b-FITC, CD4-APC, CD8-PC5.5, CD3-ECD производства компании Beckman Coulter, США. Основными гейтами были CD3⁺CD56⁺ (ТНК-клетки) и CD3⁺CD56⁺ (НК-клетки).

Статистический анализ. Качественные переменные описывали абсолютными и относительными частотами (процентами), для количественных переменных указывали медиану (Me) и интерквартильный интервал (Me [25-й перцентиль; 75-й перцентиль]). В целях определения взаимосвязей показателей использовали корреляционный анализ Спирмена. Для оценки значимости различий между двумя группами применяли критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при критическом уровне значимости 0,05.

Для оценки зависимости одной количественной переменной от другой применяли процедуру линейной регрессии. Для выявления независимых предикторов зависимой переменной использовали множественный логистический регрессионный анализ, позволяющий выявить зависимость бинарной категориальной переменной от ряда других переменных, как непрерывных, так и категориальных. С целью установления пороговых значений исследуемых показателей проводили ROC-анализ с определением чувствительности и специфичности, а также расчетом площади под характеристической кривой (AUC) с 95 % доверительным интервалом (ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование включены 80 пациентов, 44 мужчины (55 %) и 36 женщин (45 %), возраст которых составлял 49 (44,0; 56,0) лет. По

результатам ДУС артерий нижних конечностей больные были разделены на две группы: в первую вошли 46 (57,5 %) человек с атеросклерозом артерий нижних конечностей (визуализированные АСБ и/или снижение ЛПИ < 0,9); во вторую – 34 (42,5 %) пациента без АСБ в артериях нижних конечностей и ЛПИ ≥ 0,9. Клиническая характеристика пациентов обеих групп представлена в табл. 1.

Пациенты, имеющие АСБ в артериях нижних конечностей, статистически значимо старше в сравнении с пациентами второй группы. Также в первой группе была выше доля мужчин, чаще встречалась артериальная гипертензия.

Следует отметить, что среди пациентов первой группы АСБ в ОБА выявлены у 39 (84,8 %) пациентов, в ПБА – у 19 (41,3 %), в ПКА – у 26 (56,5 %) больных. Стенозирование артерий нижних конечностей >50 % было диагностировано у одного (2,17 %) пациента, а медиана максимальной для конкретного пациента степени стенозирования составляла 30,0 % (27,0; 35,0). Среди включенных пациентов не было диагностировано снижения ЛПИ < 0,9.

Результаты иммунологического исследования представлены в табл. 2 и на рис. 1.

Таким образом, пациенты с атеросклерозом артерий нижних конечностей отличались от пациентов с интактными артериями нижних конечностей статистически значимо большими значениями циркулирующих НК-клеток и меньшими – НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток. При этом в первой группе пациентов количество циркулирующих НК-CD8⁺CD11b⁺-клеток было больше в сравнении с пациентами второй группы, однако различия не являлись статистически значимыми.

С целью определения потенциальной диагностической ценности количества циркулирующих НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток в отношении наличия субклинического атеросклероза артерий нижних конечностей проведен ROC-анализ, результаты которого представлены на рис. 2.

Так, снижение количества НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток ≤16,5 в 1 мкл крови позволяло диагностировать атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей с чувствительностью 80,0 % и специфичностью 58,8 %.

По данным логистического регрессионного анализа снижение количества НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток ≤16,5 кл/мкл ассоциировалось с отношением шансов (ОШ) поражения артерий нижних конечностей 5,71 (95 % ДИ 1,44–22,6; $p = 0,013$). При проведении множественного логистического регрессионного анализа с поправкой на количество НК- и НК-CD8⁺CD11b⁺-клеток отмечалось исчезновение статистической значимости ($p = 0,06$). С другой стороны, при про-

Таблица 1

Клиническая и лабораторная характеристика пациентов

Показатель	Группа 1 (n = 46)	Группа 2 (n = 34)	p
Мужчины/женщины, n (%)	31 (67,4)/ 15 (32,6)	13 (38,2)/ 21 (61,8)	0,013
Возраст, лет, Me (ИИ)	53,0 (45,2; 57,0)	47,5 (42,0; 51,0)	0,014
ИМТ, кг/м ² , Me (ИИ)	27,4 (25,5; 30,1)	28,7 (24,9; 32,3)	0,633
Ожирение, n (%)	13 (28,2)	12 (35,3)	0,226
Абдоминальное ожирение, n (%)	27 (58,7)	21 (61,7)	0,638
Курение, n (%)	13 (28,2)	5 (14,7)	0,276
СД 2 типа, n (%)	5 (10,8)	2 (5,88)	0,069
АГ, n (%)	28 (60,8)	12 (35,3)	0,041
САД, мм рт. ст., Me (ИИ)	140 (122; 148)	132 (120; 141)	0,189
ДАД, мм рт. ст., Me (ИИ)	90,0 (80,0; 95,0)	84,0 (70,0; 90,5)	0,384
Дезагреганты, n (%)	8 (17,4)	2 (5,88)	0,177
Бета-адреноблокаторы, n (%)	14 (30,4)	5 (14,7)	0,119
Ингибиторы РААС, n (%)	17 (36,9)	4 (11,7)	0,019
Статины, n (%)	18 (39,1)	8 (23,5)	0,640
Пероральные сахароснижающие препараты, n (%)	5 (10,8)	2 (5,88)	0,229
ОХС, ммоль/л, Me (ИИ)	5,81 (5,01; 6,41)	5,81 (5,41; 6,71)	0,315
ХС ЛПНП, ммоль/л, Me (ИИ)	3,80 (3,00; 4,40)	3,30 (2,90; 4,13)	0,300
ХС ЛПВП, ммоль/л, Me (ИИ)	1,26 (1,17; 1,61)	1,46 (1,25; 1,63)	0,153
ТГ, ммоль/л, Me (ИИ)	1,40 (1,10; 1,80)	1,10 (0,70; 1,70)	0,053
Глюкоза, ммоль/л, Me (ИИ)	5,71 (5,07; 6,67)	5,44 (5,08; 5,76)	0,204
Гликированный гемоглобин, %, Me (ИИ)	5,80 (5,44; 6,14)	5,40 (5,11; 5,93)	0,032
СКФ, мл/мин/1,73 м ² , Me (ИИ)	69,5 (59,0; 93,5)	76,0 (68,0; 94,0)	0,186

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; СД – сахарный диабет; АГ – артериальная гипертензия; САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система; ОХС – общий холестерин; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности; ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ТГ – триглицериды; СКФ – скорость клубочковой фильтрации. Ожирение = ИМТ ≥ 30 кг/м²; абдоминальное ожирение = окружность талии ≥ 94 см у мужчин и ≥ 80 см у женщин.

Таблица 2

Результаты иммунологического исследования

Показатель	Группа 1 (n = 46)	Группа 2 (n = 34)	p
НК-клетки, кл/мкл	152 (102; 203)	118 (80,0; 146)	0,048
НКТ-клетки, кл/мкл	54,0 (32,5; 146)	63,0 (43,7; 95,0)	0,936
НК-CD11b ⁺ , кл/мкл	168 (109; 272)	132 (70,0; 208)	0,389
НК-CD4 ⁺ CD11b ⁺ , кл/мкл	3,00 (0,00; 15,0)	25,0 (5,00; 72,0)	0,035
НК-CD8 ⁺ CD11b ⁺ , кл/мкл	13,3 (3,00; 28,0)	6,00 (3,00; 19,0)	0,347
НКТ-CD4 ⁺ CD11b ⁺ , кл/мкл	13,0 (4,00; 27,0)	18,0 (11,0; 46,0)	0,214
НКТ-CD8 ⁺ CD11b ⁺ , кл/мкл	61,0 (14,0; 148)	62,0 (35,0; 214)	0,781

Примечание. кл/мкл – клеток в 1 мкл.

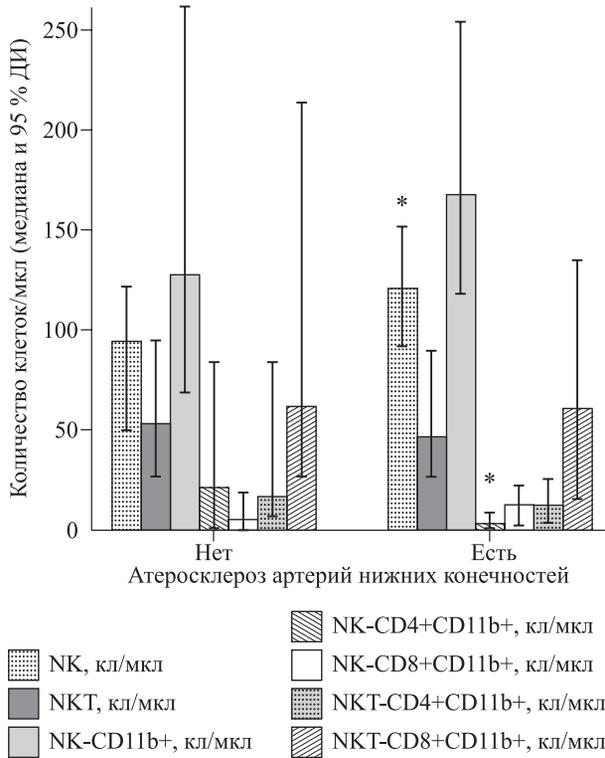


Рис. 1. NK- и NKT-клетки у пациентов обеих групп. * – различия с уровнем значимости <0,05

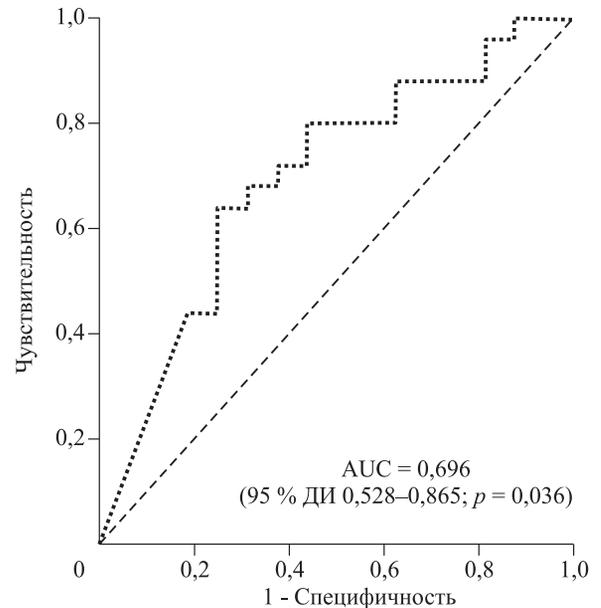


Рис. 2. ROC-кривая, демонстрирующая диагностическую значимость NK-CD4⁺CD11b⁺-клеток в отношении наличия субклинического атеросклероза артерий нижних конечностей

ведении анализа с поправкой на пол, возраст, АГ, курение, СД 2 типа, ожирение, уровни ХС ЛПНП и СКФ ОШ составляло 12,2 (95 % ДИ 1,63–90,7) и было статистически значимо ($p = 0,015$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Роль NK-клеток в атерогенезе до настоящего времени точно не установлена. В экспериментальных исследованиях показано, что NK-клетки могут участвовать в формировании и прогрессировании атеромы путем продукции интерферона- γ , перфорина и гранзима Б [12]. С другой стороны, в исследованиях с генетически измененными грызунами W. Nour-Eldine et al. установили, что ни генетически смоделированная гиперактивность NK-клеток, ни их деплеция не влияли на развитие атеросклероза [13]. По данным ряда авторов, это убедительно свидетельствует об отсутствии каузальной роли NK-клеток в атерогенезе [14]. Тем не менее поиск новых диагностических и прогностических маркеров, репрезентирующих активацию вро-

жденного и адаптивного иммунитета, является актуальной проблемой кардиоваскулярной медицины [15].

Основные результаты проведенного исследования: 1) пациенты с атеросклерозом артерий нижних конечностей в сравнении с группой сравнения отличались статистически значимо большим количеством циркулирующих NK-клеток и меньшим – NK-CD4⁺CD11b⁺-клеток; 2) снижение количества NK-CD4⁺CD11b⁺-клеток $\leq 16,5$ кл/мл позволяло диагностировать атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей с чувствительностью 80,0 % и специфичностью 58,8 %; 3) ОШ наличия поражения артерий нижних конечностей при снижении NK-CD4⁺CD11b⁺-клеток $\leq 16,5$ кл/мл составляло 5,71 (95 % ДИ 1,44–22,6; $p = 0,013$), но утрачивало статистическую значимость при добавлении в модель NK- и NK-CD8⁺CD11b⁺-клеток.

Обнаруженное нами увеличение NK-клеток в крови пациентов с атеросклерозом, согласуется с опубликованными ранее данными [5]. С другой стороны, в двух исследованиях, включавших пациентов с ишемической болезнью

сердца (ИБС), установлено снижение числа НК-клеток по сравнению с контрольной группой [16, 17]. Возможно, эти расхождения связаны с существенными различиями в клиническом статусе пациентов. Так, в работе Ł. Nak et al. уменьшение количества НК-клеток отмечено у пациентов с острым коронарным синдромом, а в исследовании N.R. Jabir et al. – у больных со стабильной ишемической болезнью сердца. По мнению ряда авторов, у пациентов с субклиническим атеросклерозом и атеросклеротическими ССЗ наблюдается прогрессивное снижение числа и функционального статуса НК-клеток по мере прогрессирования тяжести заболевания и выраженности хронического вялотекущего воспаления, что может объяснять неоднозначность результатов опубликованных исследований [18].

В настоящей работе впервые продемонстрирована диагностическая ценность количества циркулирующих НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток в отношении наличия субклинического атеросклероза артерий нижних конечностей. Возможно, что полученные взаимосвязи опосредованы общим количеством циркулирующих НК- или НК-CD8⁺CD11b⁺-клеток. В настоящее время значение НК-клеток, экспрессирующих CD4 или CD8, в контексте атерогенеза не установлено. Известно, что НК-CD8⁺ отличаются большей, чем НК-CD8⁻, цитолитической активностью и более функциональным профилем, оцениваемым по стимулированной экспрессии интерферона- γ , CD107a, фактора некроза опухолей- α и макрофагального воспалительного белка β [19]. Возможно, в представленном нами исследовании снижение числа НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток отражает увеличение количества активированных НК-CD8⁺, которое в связи с небольшим объемом выборки не достигло статистической значимости. Требуется дальнейшее изучение роли различных субпопуляций циркулирующих НК- и NKT-клеток в развитии и прогрессировании атеросклероза во взаимосвязи с показателями активации врожденного и адаптивного иммунитета.

Представленное исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, исследуемые группы пациентов значимо различались по частоте встречаемости АГ, приема ингибиторов РААС и уровню HbA1c. Известно, что при АГ и СД количество NKT-клеток варьирует, что могло также оказать влияние на полученные результаты [20]. Во-вторых, отсутствуют данные о содержании сывороточных маркеров воспаления, что затрудняет оценку уровня системного воспаления у включенных в исследование пациентов. В-треть-

их, небольшое количество включенных в исследование пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пациенты с атеросклерозом артерий нижних конечностей в сравнении с группой сравнения отличались статистически значимо большим количеством циркулирующих НК-клеток и меньшим – НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток. Снижение количества НК-CD4⁺CD11b⁺-клеток $\leq 16,5$ кл/мкл позволяло диагностировать атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей с чувствительностью 80,0 % и специфичностью 58,8 %.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Решетников О.В., Курилович С.А., Никитин Ю.П. Инфекции, воспаление и атеросклероз. *Атеросклероз*. 2019; 15 (2): 78–88. doi: 10.15372/ATER20190211
2. Kumar A., Suryadevara N., Hill T.M., Bezbradica J.S., Van Kaer L., Joyce S. Natural Killer T Cells: an ecological evolutionary developmental biology perspective. *Front Immunol*. 2017; 8: 1858. doi: 10.3389/fimmu.2017.01858
3. Zitti B., Bryceson Y.T. Natural killer cells in inflammation and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018; 42: 37–46. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.08.001
4. van Puijvelde G.H.M., Kuiper J. NKT cells in cardiovascular diseases. *Eur. J. Pharmacol*. 2017; 816: 47–57. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.052
5. Kyaw T., Tipping P., Toh B.H., Bobik A. Killer cells in atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol*. 2017; 816: 67–75. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.05.009
6. Bonaccorsi I., Spinelli D., Cantoni C., Barilla C., Pipitò N., de Pasquale C., Oliveri D., Cavaliere R., Carrega P., Benedetto F., Ferlazzo G. Symptomatic Carotid Atherosclerotic Plaques Are Associated With Increased Infiltration of Natural Killer (NK) Cells and Higher Serum Levels of NK Activating Receptor Ligands. *Front Immunol*. 2019; 10: 1503. doi: 10.3389/fimmu.2019.01503
7. Bonaccorsi I., de Pasquale C., Campana S., Barberi C., Cavaliere R., Benedetto F., Ferlazzo G. Natural killer cells in the innate immunity network of atherosclerosis. *Immunol. Lett*. 2015; 168 (1): 51–57. doi: 10.1016/j.imlet.2015.09.006
8. Sprynger M., Rigo F., Moonen M., Abovans V., Edvardsen T., de Alcantara M.L., Brodmann M., Naka K.K., Kownator S., Simova I., Vlachopoulos C., Wautrecht J.C., Lancellotti P. Focus on echovascular imaging assessment of arterial disease: complement to the ESC guidelines (PARTIM 1) in collaboration with the Working Group on Aorta and Peripheral Vascular Diseases. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*. 2018; 19 (11): 1195–1221. doi: 10.1093/ehjci/jej103
9. Mozzini C., Roscia G., Casadei A., Cominacini L. Searching the perfect ultrasonic classification in assessing carotid artery stenosis: comparison and remarks

- upon the existing ultrasound criteria. *J. Ultrasound*. 2016; 19 (2): 83–90. doi: 10.1007/s40477-016-0193-6
10. Aboyans V., Ricco J.B., Bartelink M.E.L., Björck M., Brodmann M., Cohnert T., Collet J.P., Czerny M., de Carlo M., Debus S., Espinola-Klein C., Kahan T., Kownator S., Mazzolai L., Naylor A.R., Roffi M., Röther J., Sprynger M., Tendera M., Tepe G., Venermo M., Vlachopoulos C., Desormais I. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur. Heart J.* 2018; 39 (9): 763–816. doi: 10.1093/eurheartj/ehx095
 11. Aboyans V., Criqui M.H., Abraham P., Allison M.A., Creager M.A., Diehm C., Fowkes F.G., Hiatt W.R., Jönsson B., Lacroix P., Marin B., McDermott M.M., Norgren L., Pande R.L., Preux P.M., Stoffers H.E., Treat-Jacobson D. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012; 126 (24): 2890–2909. doi: 10.1161/CIR.0b013e318276f6cb
 12. Selathurai A., Deswaerte V., Kanellakis P., Tipping P., Toh B.H., Bobik A., Kyaw T. Natural killer (NK) cells augment atherosclerosis by cytotoxic-dependent mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 2014; 102 (1): 128–137. doi: 10.1093/cvr/cvu016
 13. Nour-Eldine W., Joffre J., Zibara K., Esposito B., Giraud A., Zeboudj L., Vilar J., Terada M., Bruneval P., Vivier E., Ait-Oufella H., Mallat Z., Ugoilini S., Tedgui A. genetic depletion or hyperrespon-
 - siveness of natural killer cells do not affect atherosclerosis development. *Circ. Res.* 2018; 122 (1): 47–57. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311743
 14. Winkels H., Ley K. Natural killer cells at ease: atherosclerosis is not affected by genetic depletion or hyperactivation of natural killer cells. *Circ. Res.* 2018; 122 (1): 6–7. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312289
 15. Strassheim D., Dempsey E.C., Gerasimovskaya E., Stenmark K., Karoor V. Role of Inflammatory Cell Subtypes in Heart Failure. *J. Immunol. Res.* 2019; 2019: 2164017. doi: 10.1155/2019/2164017
 16. Hak Ł., Myśliwska J., Więckiewicz J., Szyndler K., Trzonkowski P., Siebert J., Myśliwski A. NK cell compartment in patients with coronary heart disease. *Immun. Ageing*. 2007; 4: 3. doi: 10.1186/1742-4933-4-3
 17. Jabir N.R., Firoz C.K., Ahmed F. et al. Reduction in CD16/CD56 and CD16/CD3/CD56 Natural Killer Cells in Coronary Artery Disease. *Immunol. Invest.* 2017; 46 (5): 526–535. doi: 10.1080/08820139.2017.1306866
 18. Backteman K., Ernerudh J., Jonasson L. Natural killer (NK) cell deficit in coronary artery disease: no aberrations in phenotype but sustained reduction of NK cells is associated with low-grade inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 2014; 175 (1): 104–112. doi: 10.1111/cei.12210
 19. Ahmad F., Hong H.S., Jäckel M., Jablonka A., Lu I.N., Bhatnagar N., Eberhard J.M., Bollmann B.A., Ballmaier M., Zielinska-Skowronek M., Schmidt R.E., Meyer-Olson D. High frequencies of polyfunctional CD8+ NK cells in chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression. *J. Virol.* 2014; 88 (21): 12397–12408. doi: 10.1128/JVI.01420-14
 20. Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Богданов А.Р., Сенцова Т.Б., Залетова Т.С., Кузнецов В.Д. Клеточный иммунитет у больных с артериальной гипертонией и ожирением. *Вопросы питания*. 2012; 81 (6): 19–26.

FEATURES OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF CIRCULATING NK AND NKT CELLS IN PATIENTS WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS OF LOWER LIMB ARTERIES

V.V. Genkel, I.I. Dolgushin, I.L. Baturina, I.V. Emelyanov, A.Yu. Savochkina, I.I. Shaposhnik

*South-Ural State Medical University of Minzdrav of Russia
454092, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64*

Aim of the study was to investigate the features of the subpopulation composition of circulating NK and NKT cells and their diagnostic value in middle-aged patients, depending on the presence of subclinical atherosclerosis of lower limb arteries. **Material and methods.** The study included 80 patients (44 men (55.0 %) and 36 women (45.0 %)), whose age was 49.0 (44.0; 56.0) years. All patients underwent duplex ultrasound scanning (DUS) of the arteries of the lower extremities. Lymphocyte immunophenotyping was performed on a Navios 6/2 flow cytometer (Beckman Coulter, USA) using labeled mouse monoclonal antibodies CD45-PC7.0, CD16-PE, CD11b-FITC, CD4-APC, CD8-PC5.5, CD3-ECD manufactured by Beckman Coulter, USA. **Results.** According to the results of the DUS of the arteries of the lower extremities, the patients were divided into two groups: the first group included 46 (57.5 %) patients with lower extremity artery atherosclerosis, the second group included 34 (42.5 %) patients without plaques in lower extremity artery. Patients of first group had significantly higher, than patients of second group, number of circulating NK cells and lower number of CD4⁺CD11b⁺ NK cells. The decrease in the CD4⁺CD11b⁺ NK cell number ≤ 16.5 cells/ μ l allowed to diagnose lower extremity artery atherosclerosis with a sensitivity of 80.0 % and a specificity of

58.8 %. According to logistic regression analysis, a decrease in the number of CD4⁺CD11b⁺ NK cells ≤ 16.5 cells/ μ l was associated with a odds ratio of lower extremity artery atherosclerosis 5.71 (95 % confidence interval (CI) 1.44-22.6; $p = 0.013$). **Conclusion.** Compared with the control group, patients with lower extremity artery atherosclerosis differed in a statistically significantly larger number of circulating NK cells and a smaller number of CD4⁺CD11b⁺ NK cells. The decrease in the number of latter ≤ 16.5 cells/ μ l allowed to diagnose lower extremity artery atherosclerosis with a sensitivity of 80.0% and a specificity of 58.8 %.

Keywords: atherosclerosis, lower limb arteries, natural killer cells, natural killer T cells.

*Статья поступила 5 июля 2020 г.
Принята к печати 12 августа 2020 г.*