

ISSN 1563-0625 (print)
ISSN 2313-741X (online)

Том 24, № 6. С. 1079-1274

2022

Официальный журнал
Санкт-Петербургского Регионального Отделения
Российской Ассоциации
Аллергологов и Клинических Иммунологов

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ
(СПб РО РААКИ)

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2022, том 24

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдлин Ирина Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Тотоян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, президент Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

Караулов Александр Викторович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, Москва, Россия

Недоспасов Сергей Артурович – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ им. М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии им. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:
д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:
Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

Электронная версия: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г. Свидетельство о регистрации № П 3612.

Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций 30 июня 2003 г.

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФЦ77-60436 30 декабря 2014 г.

Данный материал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 License.

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 15.11.2022 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 24,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 063

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 83, корп. 1, Литер А

Тел.: (812) 950-10-99.

С 2001 года журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

С 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS.

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Хаитов Рахим Мусаевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

Редакционный совет

Ласунская Елена – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

Мароди Ласло – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

Михалек Ярослав – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

Роггенбук Дирк – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лаузиц «University of Applied Sciences», Зенфтенберг, Германия

Сеонг Сеунг-Йонг – доктор медицинских наук, Национальный Университет, руководитель кафедры микробиологии и иммунологии, Сеул, Корея

Тендлер Евгений – доктор медицинских наук, Медицинский центр Рамбам, Отдел клинической биохимии, Хайфа, Израиль

Фейст Евгений – доктор медицинских наук, Университет Гумбольдта, клиника «Шаритэ», руководитель отделения ревматологии и клинической иммунологии, Берлин, Германия

Халдояниди Софья – доктор медицинских наук, профессор, Институт молекулярных исследований, Сан-Диего, Калифорния, США

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH

(SPb RAACI)

**MEDICAL
IMMUNOLOGY/
MEDITSINSKAYA
IMMUNOLOGIYA**

November-December

2022, volume 24

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

Irina S. Freidlin – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS full member, Saint Petersburg Pasteur Institute, Director, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Vladimir A. Kozlov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Scientific Director, Novosibirsk, Russian Federation

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, President, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Alexander V. Karaulov – PhD, MD, Professor, RAS full member, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Clinical Immunology and Allergology, Chief, Moscow, Russia

Sergei A. Nedospasov – PhD, Professor, RAS full member, Lomonosov State University, Department of Immunology, Chief; Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlovin, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58

Address for correspondence:

197101, St. Petersburg, P.O. Box 130.

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

This material is distributed under the Creative Commons Attribution 4.0 License.

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64.

Passed for printing 15.11.2022. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 26.75. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilievsky Island, 83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science.

Since 2016, the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database.

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnosics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Rahim M. Khaitov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Elena R. Chernykh – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russian Federation

Editorial Council

Eugen Feist – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Sophia Khaldoyanidi – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

Elena Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

László Maródi – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

Jaroslav Michálek – PhD, MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dirk Roggenbuck – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

Seung-Yong Seong – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

Yevgeny Tendler – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Гребенкина П.В., Михайлова В.А., Ошколова А.А., Вершинина С.О., Духинова М.С., Баженов Д.О., Сельков С.А., Соколов Д.И.
ДЕЦИДУАЛЬНЫЕ ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ И КЛЕТКИ ТРОФОБЛАСТА: КЛЕТочНЫЕ, ГУМОРАЛЬНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 1085
- Смирнова О.В., Гершкорн Ф.А.
РОЛЬ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА, ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ И АДИПОКИНОВ В РАЗВИТИИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ 1109

Оригинальные статьи

- Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Пашкина Е.А., Гришина Л.В., Ильина Н.А., Чумасова О.А., Сизиков А.Э., Козлов В.А.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОРНЫХ МОЛЕКУЛ АВТОНОМНОГО И НЕАВТОНОМНОГО ВЛИЯНИЯ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТочНОГО СОСЕДСТВА» В КУЛЬТУРЕ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РА..... 1119
- Мохаммад А., Филина Ю.В., Ларионова Р.В., Арлеевская М.И., Габдулхакова А.Г.
ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ФОРМИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ В ГРАНУЛОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ..... 1139
- Шевела Е.Я., Бухтуева Н.Г., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Пасман Н.М., Черных Е.Р.
ЭКСПРЕССИЯ M2-АССОЦИИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ В СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ У ФЕРТИЛЬНЫХ НЕБЕРЕМЕННЫХ И БЕРЕМЕННЫХ С НЕОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТАЦИЕЙ..... 1151
- Малашенкова И.К., Ушаков В.Л., Крынский С.А., Огуцов Д.П., Хайлов Н.А., Ратушный А.Ю., Чекулаева Е.И., Захарова Н.В., Костюк Г.П., Дидковский Н.А.
АССОЦИАЦИЯ УРОВНЯ ЦИТОКИНА IL-17A С ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ПРОФИЛЕМ И РЕЗУЛЬТАТАМИ СТРУКТУРНОЙ МРТ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ..... 1159
- Агарков Н.М., Лев И.В., Ярошевич Е.А.
АНАЛИЗ УРОВНЕЙ И КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ С ЛЕГКИМИ И УМЕРЕННЫМИ КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ 1171
- Бычкова Н.В., Крутикова И.В., Чернышова А.В., Калинина Н.М.
КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К АЛЛЕРГЕНАМ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ В ТЕСТЕ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ..... 1179
- Чудаков Д.Б., Коновалова М.В., Коцарева О.Д., Шевченко М.А., Стрельцова М.А., Сергеев А.А., Фаттахова Г.В.
РАННЯЯ ПРОДУКЦИЯ IgE СВЯЗАНА С НАКОПЛЕНИЕМ CD11b⁺ КЛАССИЧЕСКИХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И CD11b⁺CD11c⁺ МАКРОФАГОВ В ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ..... 1189
- Юренко А.В., Антонюк М.В., Минеева Е.Е., Ходосова К.К.
ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ И СОСТОЯНИЯ МАЛЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ЛЕГКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ С ОЖИРЕНИЕМ 1205
- Колосова Н.П., Ильичева Т.Н., Святченко С.В., Даниленко А.В., Онхонова Г.С., Иванова К.И., Суслопаров И.М., Рыжиков А.Б.
ПЕРВЫЕ И ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ ГРИППА В 2020-2022 гг. И ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ НАКАНУНЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЕЗОНА 1219
- Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тололян Арег А.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ ТREC И КREC У ЛИЦ СТАРШЕ 18 ЛЕТ 1227
- Ищенко О.В.
ВЛИЯНИЕ АЭРОТОКСИКАНТОВ НА ВЫБРОС ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ОБСТРУКТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ..... 1237

Краткие сообщения

- Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С., Мамус М.А.
ВЛИЯНИЕ РЕАКТИВНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТочНЫХ ЛОВУШЕК ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ..... 1249
- Огуркова О.Н., Драгунова М.А., Сулова Т.Е., Лугачева Ю.Г., Баталов Р.Е.
АНАЛИЗ СИСТЕМЫ CD40 – ЛИГАНД CD40 У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ НЕКЛАПАННОГО ГЕНЕЗА..... 1255

Случай из практики

- Корженевский А.А., Корженевская Н.П.
СЛУЧАЙ ДЛИТЕЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ 1265

- Правила для авторов** 1271

- Авторский указатель** 1274

- Предметный указатель**..... 1274

CONTENTS

Reviews

Grebenkina P.V., Mikhailova V.A., Oshkolova A.A., Vershinina S.O., Dukhinova M.S., Bazhenov D.O., Selkov S.A., Sokolov D.I.
DECIDUAL NATURAL KILLER CELLS AND TROPHOBLAST CELLS: CELLULAR, HUMORAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF INTERACTION 1085

Smirnova O.V., Gershkoron F.A.
ROLE OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR, PROINFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES, TRANSCRIPTION FACTORS AND ADIPOKINES IN DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN METABOLIC SYNDROME 1109

Original articles

Abramova T.Ya., Blinova E.A., Pashkina E.A., Grishina L.V., Ilina N.A., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Kozlov V.A.
STUDIES OF EFFECTOR MOLECULES EXERTING AUTONOMOUS AND NON-AUTONOMOUS INFLUENCE OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS UNDER THE CONDITIONS OF *IN VITRO* "CELL NEIGHBORHOOD" IN HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS 1119

Mohammad A., Filina Yu.V., Larionova R.V., Arleevskaya M.I., Gabdulhakova A.G.
EXPRESSION AND FUNCTION OF RECEPTORS FOR THE FORMYLATED PEPTIDES IN GRANULOCYTES OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS 1139

Shevela E.Ya., Bukhtueva N.G., Tikhonova M.A., Leplina O.Yu., Pasman N.M., Chernykh E.R.
EXPRESSION OF M2-ASSOCIATED MOLECULES IN CIRCULATING MONOCYTE SUBSETS IN FERTILE NON-PREGNANT WOMEN AND PREGNANT WOMEN WITH UNCOMPLICATED PREGNANCY 1151

Malashenkova I.K., Ushakov V.L., Krynskiy S.A., Ogurtsov D.P., Khailov N.A., Ratushnyy A.Yu., Chekulaeva E.I., Zakharova N.V., Kostyuk G.P., Didkovsky N.A.
ASSOCIATION OF IL-17A LEVELS WITH IMMUNEINFLAMMATORY PROFILE AND STRUCTURAL MRI DATA IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA..... 1159

Agarkov N.M., Lev I.V., Yaroshevich E.A.
EVALUATION OF BLOOD INTERLEUKIN LEVELS AND THEIR CORRELATIONS IN THE PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY WITH MILD AND MODERATE COGNITIVE IMPAIRMENT 1171

Bychkova N.V., Krutikova I.V., Chernyshova A.V., Kalinina N.M.
CLINICAL SIGNIFICANCE OF SENSITIZATION TO HOUSE DUST MITE ALLERGENS USING FLOW CYTOMETRY-BASED BASOPHIL ACTIVATION TEST..... 1179

Chudakov D.B., Konovalova M.V., Kotsareva O.D., Shevchenko M.A., Streltsova M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V.
EARLY IgE PRODUCTION IS ASSOCIATED WITH ACCUMULATION OF CD11b⁺ CLASSICAL DENDRITIC CELLS AND CD11b⁺CD11c⁺ MACROPHAGES IN SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE..... 1189

Yurenko A.V., Antonyuk M.V., Mineeva E.E., Khodosova K.K.
PATHOPHYSIOLOGICAL RELATION BETWEEN THE SYSTEMIC INFLAMMATION AND THE STATE OF SMALL AIRWAYS IN MILD ASTHMA WITH OBESITY 1205

Kolosova N.P., Ilyicheva T.N., Svyatchenko S.V., Danilenko A.V., Onkhonova G.S., Ivanova K.I., Susloparov I.M., Ryzhikov A.B.
INITIAL AND SEVERE CASES OF INFLUENZA IN 2020-2022 AND POPULATION IMMUNITY PRIOR TO EPIDEMIC SEASON 1219

Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetsova R.N., Totolian Areg A.
DETERMINATION OF REFERENCE VALUES FOR TREC AND KREC IN CIRCULATING BLOOD OF THE PERSONS OVER 18 YEARS..... 1227

Ishchanka A.U.
EFFECT OF TOXIC AIR POLLUTANTS ON THE CYTOKINE RELEASE BY LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE..... 1237

Short communications

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A.
EFFECT OF REACTIVE INFLAMMATION IN OSTEOARTHRITIS ON EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION BY CIRCULATING NEUTROPHILS 1249

Ogurkova O.N., Dragunova M.A., Suslova T.E., Lugacheva Yu.G., Batalov R.E.
EVALUATION OF THE CD40 RECEPTOR-LIGAND SYSTEM IN THE PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION OF NONVALVULAR GENESIS 1255

Clinical case

Korzhenevsky A.A., Korzhenevskaya N.P.
A CASE OF LONG-TERM TOLERANCE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION 1265

Instructions to Authors 1271

Author index 1274

Subject index 1274

ДЕЦИДУАЛЬНЫЕ ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ И КЛЕТКИ ТРОФОБЛАСТА: КЛЕТОЧНЫЕ, ГУМОРАЛЬНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Гребенкина П.В.¹, Михайлова В.А.^{1,3}, Ошколова А.А.¹,
Вершинина С.О.², Духинова М.С.², Баженов Д.О.¹, Сельков С.А.^{1,3},
Соколов Д.И.^{1,3}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Естественные киллеры (НК-клетки) представляют группу лимфоцитов врожденного иммунитета. Помимо НК-клеток периферической крови описаны тканерезидентные популяции. Одной из локальных популяций НК-клеток являются НК-клетки децидуальной оболочки – децидуальные НК-клетки. Децидуальные НК-клетки отличаются по фенотипу и функциям от НК-клеток периферической крови. Эти клетки обладают преимущественно регуляторными свойствами, в то же время они сохраняют способность к реализации цитотоксичности. В матке НК-клетки находятся рядом с клетками плодового происхождения – клетками трофобласта, дифференцирующимися из наружного слоя инвазирующей бластоцисты. Целью обзора явился анализ литературных данных по изучению молекулярных механизмов взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта, а также путей регуляции этих взаимодействий. В обзоре представлены имеющиеся на сегодняшний день данные о рецепторных (как за счет адгезионных молекул, так и цитотоксических рецепторов) и дистантных (с участием цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, секретируемых обоими типами клеток) взаимодействиях НК-клеток и клеток трофобласта. Рассмотрены рецепторы, регулирующие контакты НК-клеток и клеток трофобласта с внеклеточным матриксом. В обзоре также представлена информация об активируемых каскадах сигнальных путей в НК-клетках и клетках трофобласта в результате их взаимодействия друг с другом и компонентами внеклеточного матрикса. К настоящему времени молекулярные механизмы регуляции функций НК-клеток и их взаимодействия с клетками трофобласта недостаточно изучены. Авторами предпринята попытка рассмотрения молекулярных ме-

Адрес для переписки:

Гребенкина Полина Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии
имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3д.
Тел.: 8 (905) 802-85-58.
E-mail: grebenkinap@gmail.com

Address for correspondence:

Polina V. Grebenkina
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology
and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleevskaya line, 3d.
Phone: +7 (905) 802-85-58.
E-mail: grebenkinap@gmail.com

Образец цитирования:

П.В. Гребенкина, В.А. Михайлова, А.А. Ошколова,
С.О. Вершинина, М.С. Духинова, Д.О. Баженов,
С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Децидуальные
естественные киллеры и клетки трофобласта:
клеточные, гуморальные и молекулярные механизмы
взаимодействия» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 6. С. 1085-1108.
doi: 10.15789/1563-0625-DNK-2540

© Гребенкина П.В. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

P.V. Grebenkina, V.A. Mikhailova, A.A. Oshkolova,
S.O. Vershinina, M.S. Dukhinova, D.O. Bazhenov,
S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Decidual natural killer cells and
trophoblast cells: cellular, humoral and molecular mechanisms
of interaction", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1085-1108.
doi: 10.15789/1563-0625-DNK-2540

© Grebenkina P.V. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DNK-2540

ханизмов регуляции функциональной активности НК-клеток с участием медиаторного комплекса РНК-полимеразы II. Описано участие комплекса циклин-зависимых киназ CDK8/19, которые входят в состав медиаторного комплекса, в функционировании клеток иммунной системы. Рассмотрены данные об участии CDK8/19 в регуляции внутриклеточных путей сигналинга, а также влияние CDK8/19 на функции НК-клеток. Суммируя представленные в литературе данные, подчеркивается, что при беременности в децидуальной оболочке матки имеет место обширное двустороннее влияние НК-клеток и клеток трофобласта друг на друга, что приводит к изменению фенотипа и функций этих клеток. Перспективным является экспериментальное изучение вклада молекулярных механизмов, вовлеченных в процессы транскрипции и трансляции, в том числе с участием CDK8/19, в биологию НК-клеток, и в поддержание взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта.

Ключевые слова: НК-клетки, трофобласт, взаимодействие, цитокины, рецепторы, циклинзависимые киназы, сигнальные пути

DECIDUAL NATURAL KILLER CELLS AND TROPHOBLAST CELLS: CELLULAR, HUMORAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF INTERACTION

Grebenkina P.V.^a, Mikhailova V.A.^{a, c}, Oshkolova A.A.^b,
Vershina S.O.^b, Dukhinova M.S.^b, Bazhenov D.O.^a, Selkov S.A.^{a, c},
Sokolov D.I.^{a, c}

^a D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

^b National Research ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

^c First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Natural killer cells (NK cells) represent a group of lymphocytes of innate immunity. In addition to NK cells of peripheral blood, tissue-resident populations are described. NK cells of the decidual envelope (decidual NK cells) represent one of the local NK cell populations. Decidual NK cells differ in phenotype and function from peripheral blood NK cells. These cells have, mainly, regulatory functions. At the same time they retain the ability to perform cytotoxic effects. In the uterus, NK cells are located closely to the cells of fetal origin, i.e., trophoblast cells, which differentiate from the outer layer of the invading blastocyst. The purpose of the review article was to analyze the literature data on the studies of the molecular interactions between NK cells and trophoblast cells, as well as potential means of regulating these interactions. The review presents currently available data on receptor-mediated effects (due to adhesion molecules and cytotoxic receptors) and distant interactions (involving cytokines, chemokines and growth factors secreted by the both cell types) between NK population and trophoblast cells. The receptors regulating contacts of NK cells and trophoblast cells with extracellular matrix are also considered. The review provides information on activation of signaling pathways in NK cells and trophoblast cells resulting from their interaction with each other and components of the extracellular matrix. Currently, the molecular mechanisms regulating the NK cell functions and their interaction with trophoblast cells have not been studied sufficiently. The authors attempted to consider molecular regulation of the functional activity of NK cells mediated by the molecular complex of RNA polymerase II. We also describe participation of cyclin-dependent CDK8/19 kinases which comprise a part of the mediator complex which provides functioning of immune cells. The data on the participation of CDK8/19 in regulation of intracellular signaling pathways, as well as influence of CDK8/19 on the NK cell functions, are considered. Summarizing the data presented in the literature, one may emphasize that there is an extensive mutual influence of NK cells and trophoblast cells in decidual lining of uterus during pregnancy, thus leading to a changes in phenotype and functions of these cells. Experimental studies are required on the contribution of molecular mechanisms involved in transcription and translation processes to the biology of NK cells, and their role in maintaining interactions between NK cells and trophoblast cells, including the pathways involving CDK8/19.

Keywords: NK cells, trophoblast, interaction, cytokines, receptors, cyclin-dependent kinases, signaling pathways

Поддержано грантом РФФ 21-15-00021. Участие Д.О. Баженова поддержано грантом РФФИ 20-315-90003.

Введение

Естественные киллеры (от англ. Natural killer (NK) cells) представляют собой популяцию лимфоидных клеток врожденного иммунитета, которые способны к реализации как противоопухолевых, так и противовирусных механизмов иммунной защиты [93, 135]. Особой популяцией NK-клеток являются NK-клетки матки, присутствующие в эндометрии до беременности. В случае наступления беременности количество этих клеток возрастает, составляя до 70% от всей популяции лимфоидных клеток материнской части плаценты – децидуальной оболочки [58, 140]. Децидуальные NK-клетки (dNK-клетки) отличаются особым фенотипом, а именно большей экспрессией рецептора CD56 и минимальной экспрессией рецептора CD16, а также иммуномодулирующими функциями [123]. NK-клетки, находясь в децидуальной оболочке, могут контактировать с клетками плодового происхождения. После оплодотворения из внешнего слоя клеток бластоцисты формируется трофоэктодерма, являющаяся источником клеток трофобласта. Две основные группы этих клеток – цитотрофобласт и синцитиотрофобласт, формируют структуру ворсин плаценты [120]. Основной функцией клеток синцитиотрофобласта является обмен веществ между организмом матери и плода [137]. Клетки цитотрофобласта формируют инвазивный вневорсинчатый трофобласт, клетки которого внедряются в децидуальную оболочку (интерстициальный трофобласт) и участвуют в процессах ремоделирования спиральных артерий (эндovasкулярный трофобласт) [16]. NK-клетки децидуальной оболочки обеспечивают контролируемую инвазию бластоцисты в стенку матки, взаимодействуя с клетками вневорсинчатого трофобласта. Взаимодействие dNK-клеток и клеток трофобласта важно для физиологического развития беременности и может регулироваться как за счет лиганд-рецепторных взаимодействий, так и с помощью цитокинов и других веществ. **Целью обзора** явилось рассмотрение механизмов взаимодействия NK-клеток с клетками трофобласта, а также путей регуляции этих взаимодействий.

Лиганд-рецепторные взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта

Клетки вневорсинчатого трофобласта экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-C (от англ. Human Leukocyte Antigens – человеческий лейкоцитарный антиген), которые распознают рецепторы семейства KIR (от англ. Killer-cell immunoglobulin-like receptor – иммуно-

глобулинподобный рецептор киллерных клеток) (CD158) dNK-клеток [80]. Гаплотипы KIR определяются как А или В. Гаплотипы А содержат в основном гены ингибиторных KIR, а гаплотипы В имеют дополнительные гены, кодирующие активирующие KIR [92, 139]. При беременности материнский генотип KIR может быть AA, АВ или ВВ [139]. Лиганды HLA-C, распознаваемые KIR, делят на две группы: HLA-C1 и HLA-C2, причем HLA-C2 обладает большим сродством к KIR-белкам [153].

Наличие на NK-клетках активирующего рецептора CD158a (KIR2DS1) (гаплотип В) предотвращает развитие нарушений беременности, а его отсутствие (гаплотип А) приводит к увеличению риска осложнений беременности [147]. Сходный эффект описан для другого активирующего рецептора, CD158I (KIR2DS4), когда он экспрессирован на поверхности NK-клеток вместе с CD158a. Подобно CD158a, связывание CD158I dNK-клеток с лигандом HLA-C на поверхности клеток плода приводит к повышению относительного количества NK-клеток, содержащих внутриклеточный GM-CSF (от англ. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), способствующий инвазии клеток трофобласта [62]. Показано, что женщины, гомозиготные по гаплотипу KIR А, в большей степени подвержены риску невынашивания беременности. Это может происходить в том случае, если у плода больше генов HLA-C2, чем у матери, либо дополнительные аллели HLA-C2 плода имеют отцовское происхождение [4, 50]. Таким образом, взаимодействие KIR HLA-C представляет собой один из механизмов регуляции инвазии и жизнеспособности клеток трофобласта.

Молекулы HLA-G, экспрессируемые клетками трофобласта, участвуют в поддержании иммунной толерантности к клеткам плода. Установлено, что NK-клетки при взаимодействии с HLA-G снижают свои цитотоксические свойства, что приводит к выживанию клеток-мишеней [119]. Показано, что HLA-G связывается только с двумя рецепторами на поверхности NK-клеток (CD158D и CD85). Эти взаимодействия между HLA-G-экспрессирующими клетками и NK-клетками приводят к снижению синтеза естественными киллерами некоторых цитокинов, в том числе TNF α , IL-6, IL-8 и IFN γ [145].

Молекулы HLA-E, экспрессируемые клетками трофобласта, взаимодействуют с рецепторами семейства CD94 (NKG2), что приводит к снижению цитотоксической активности NK-клеток и также может служить одним из механизмов обеспечения толерантности по отношению к плоду [63].

Белки MICA/B являются лигандами для активирующего рецептора NK-клеток CD314 (NKG2D). Описана роль белков MICA/B в избегании иммунного ответа различными злокачественными опухолями [40]. В последнее время рассматривается роль MICA/B в развитии толерантности матери к полуаллогенному плоду в связи с обнаружением этих белков в плаценте, а именно в клетках синцитиотрофобласта [90]. Потеря MICA/B, вероятно, способствует избеганию распознавания клеток трофобласта с помощью CD314 рецепторов NK-клеток. Показано, что растворимая форма MICA/B в сыворотке крови беременных женщин снижает интенсивность экспрессии NK-клетками CD314, а также снижает их цитотоксическую активность [160].

Взаимодействие CD366 (Tim-3 – от англ. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 – T-клеточная молекула, содержащая домен иммуноглобулина и муцина) и его лиганда галектина-9 (Gal-9) изначально описано в качестве механизма формирования иммунной толерантности T-клеток [25]. Около 60% dNK-клеток экспрессируют CD366. У dNK-клеток, полученных после самопроизвольного аборта, отмечают сниженную экспрессию Tim-3 [149]. CD366⁺NK-клетки характеризуются повышенной секрецией IL-4 и сниженной экспрессией TNF α . Клетки трофобласта экспрессируют лиганд CD366 – галектин-9 (Gal-9). При добавлении к NK-клеткам липополисахаридов отмечается повышенная выработка провоспалительного цитокина TNF α . Однако этот эффект отменяется при добавлении рекомбинантного Gal-9 [74]. Это может указывать на роль этого сигнального пути в поддержании толерантности по отношению к клеткам плода.

В таблице 1 представлены рассмотренные выше лиганд-рецепторные взаимодействия клеток трофобласта и NK-клеток и активируемые при этом сигнальные пути.

Рецепторы NK-клеток и клеток трофобласта обеспечивают взаимодействие этих клеток с другими клетками децидуальной оболочки. Установлено, что адгезия и инвазия клеток трофобласта регулируются селектинами. На клетках цитотрофобласта, а также инвазивного трофобласта экспрессированы молекулы CD62L (L-селектин), причем его содержание снижается по мере развития беременности. Клетки синцитиотрофобласта экспрессируют молекулы CD62P (P-селектин) [32]. Лигандами селектинов являются гликопротеин лиганд P-селектина-1, экспрессированный на лейкоцитах [47], и CD44 на поверхности эндотелиальных клеток и клеток трофобласта [15]. Молекулы CD31 (PECAM-1) экспрессированы на поверхности NK-клеток,

также CD31 экспрессирован на клетках эпителия и эндотелия. Так как для CD31 характерно гомофильное лиганд-рецепторное взаимодействие, его экспрессия играет важную роль в миграции NK-клеток. Более того, связывание CD31 с лигандом стимулирует экспрессию β 2-интегрина в NK-клетках [11, 69].

Адгезионные рецепторы LFA, представляющие собой гетеродимерные интегрины, принимают участие в процессах миграции лейкоцитов. На поверхности NK-клеток экспрессированы CD11a (LFA-1), CD2 (LFA-2) и CD58 (LFA-3) [81, 82]. Эти белки необходимы не только для адгезии NK-клеток, но и для формирования иммунологического синапса с последующим высвобождением перфорина. Поверхностный рецептор NK-клеток CD56 также участвует в регуляции взаимодействия с клеткой-мишенью, связываясь с CD11a/CD58 [99].

Таким образом, NK-клетки и клетки трофобласта могут контактировать посредством адгезионных рецепторов, в том числе формирующих иммунологический синапс между клетками. Цитотоксические рецепторы NK-клеток связывают их лиганды на мембране клеток трофобласта, исход контакта с NK-клетками зависит от рецепторного профиля трофобласта. В стенке матки NK-клетки и клетки трофобласта могут располагаться вблизи элементов внеклеточного матрикса.

Взаимодействие клеток трофобласта и NK-клеток с внеклеточным матриксом

В настоящее время внеклеточный матрикс (ВМ) рассматривается в качестве важного элемента контроля эмбриогенеза. ВМ участвует в поддержании целостности эндометрия и имплантации бластоцисты [100]. На поверхности клеток трофобласта экспрессированы рецепторы, задействованные в процессах взаимодействия с внеклеточным матриксом. К таким молекулам относят интегрины, кадгеринины, селектины и нектины.

Интегрины представляют собой гетеродимерные рецепторы, состоящие из различных комбинаций α и β субъединиц [56]. Некоторые интегрины содержат β 1- и α v-субъединицы [55]. Интегрины на поверхности клеток трофобласта взаимодействуют с лигандами во внеклеточном матриксе – ламининами, коллагеном IV, витронектином, фибронектином, а также рецепторами клеточной адгезии – белками CD106 (VCAM-1), CD31, EMILIN-1 [2].

На поверхности пролиферирующих клеток колонок цитотрофобласта обнаружен CD49b (интегрин α 2, VLA-2), причем его содержание снижается в течение беременности [68]. Веретеновидные клетки интерстициального трофобласта,

ТАБЛИЦА 1. ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НК-КЛЕТОК И КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА

TABLE 1. LIGAND-RECEPTOR INTERACTIONS BETWEEN NK CELLS AND TROPHOBLAST CELLS

Рецептор на НК-клетках Receptor on NK cells		Лиганд на клетках трофобласта Ligand on trophoblast cells		Краткое описание взаимодействия Brief description of interaction
Рецептор Receptor	Сигнальный путь Signal pathway	Рецептор Receptor	Сигнальный путь Signal pathway	
CD158 (KIR)	Акт, NF-κB (показано на НК-клетках периферической крови) [114] Akt, NF-κB (shown on peripheral blood NK cells) [114]	HLA-C HLA-G	Нет данных No data	Регуляция цитотоксических свойств НК-клеток и синтеза ими цитокинов [62, 119, 145] Regulation of cytotoxic properties of NK cells and their synthesis of cytokines [62, 119, 145]
CD85 (LILR-1)	Нет данных No data	HLA-G	Нет данных No data	Регуляция цитотоксических свойств НК-клеток и синтеза ими цитокинов [145] Regulation of cytotoxic properties of NK cells and their synthesis of cytokines [145]
CD94 (NKG2)	Нет данных No data	HLA-E	Нет данных No data	Регуляция цитотоксических свойств НК-клеток [63] Regulation of cytotoxic properties of NK cells [63]
CD314 (NKG2D)	PI3K (показано на клеточной линии НК-92) [30, 42] PI3K (shown in NK-92 cell line) [30, 42]	MICA/B	Нет данных No data	Регуляция цитотоксических свойств НК-клеток [160] Regulation of cytotoxic properties of NK cells [160]
CD366 (Tim-3)	Нет данных No data	Gal-9	Нет данных No data	Регуляция цитотоксических свойств НК-клеток [74] Regulation of cytotoxic properties of NK cells [74]
Образуемые нанотрубки между клетками Nanotubes formed between cells				Передача антимикробных белков [22] Transport of antimicrobial proteins [22]

экспрессируют CD49e (интегрин $\alpha 5\beta 1$, VLA-5), CD61 (интегрин $\alpha v\beta 3$). Большие полигональные клетки, расположенные у базальной мембраны децидуальной оболочки интерстициального трофобласта, экспрессируют $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 5\beta 1$ интегрин. Клетки цитотрофобласта и эндovasкулярного трофобласта также экспрессируют интегрин $\alpha 5\beta 1$, однако установлено, что в случае выкидыша в ранние сроки клетки эндovasкулярного трофобласта экспрессируют интегрин с измененным гликозилированием $\beta 1$ -субъединицы [166]. В течение второго и третьего триместра беременности на клетках цитотрофобласта обнаруживают интегрин $\alpha 3\beta 1$ [2]. Интегрины способствуют миграции и инвазии клеток трофобласта, усиливают его закоривание в децидуальной оболочке [2]. Некоторые интегрин участвуют в формировании пула иммунных клеток децидуальной оболочки. Так, при введении ингибиторов экспрес-

сии интегрин $\alpha v\beta 3$ в периферической крови беременных мышей повышалось число цитотоксических НК-клеток [148].

Кадгерин — кальций-зависимые интегральные гликопротеины, ассоциированные с белками цитоскелета. Из кадгеринов I типа на клетках цитотрофобласта и синцитиотрофобласта экспрессированы CD324 (E-кадгерин) и P-кадгерин [13, 121]. Кадгерин II типа — молекулы CD144 (VE-кадгерин) и OV-кадгерин экспрессированы на поверхности клеток синцитиотрофобласта и цитотрофобласта [2, 43]. Молекулы K-кадгерин в течение первого триместра беременности обнаруживается только на клетках синцитиотрофобласта [7]. Десмосомальные кадгерин — десмоглеин 2 и 3, экспрессированы на клетках цитотрофобласта и синцитиотрофобласта [2], обнаруживаются в составе протеома первичных клеток трофобласта [116]. Кадгерин

усиливают адгезию клеток трофобласта в децидуальной оболочке, обеспечивают встраивание в спиральные артерии. Низкий уровень экспрессии CD324 и К-кадгерина ассоциирован с первичным бесплодием и повторяющимися выкидышами [10].

Нектины представляют собой адгезионные молекулы, задействованные в образовании адгезивных и плотных контактов [134]. На апикальной поверхности клеток синцитиотрофобласта экспрессированы молекулы нектина-4 [57]. Нектины могут оказывать положительное влияние на инвазию клеток путем регуляции матриксных металлопротеаз: опухолевые клетки с повышенной экспрессией нектина-3 характеризуются повышенной экспрессией MMP-2 и MMP-9 [162]. Однако в плацентах женщин с преэклампсией наблюдается повышенное содержание нектина-4 [57], что указывает на сложность механизма регуляции инвазии клеток трофобласта.

Среди адгезионных рецепторов NK-клеток выделяют селектины [36]. Более того, посредством лигандов селектинов на своей поверхности естественные киллеры могут взаимодействовать с селектинами внеклеточного пространства [108]. Молекулы CD49d (VLA-4) и CD49e (VLA-5), также экспрессированные на NK-клетках, при взаимодействии с фибронектином и CD106 обеспечивают миграцию NK-клеток [35, 130]. Гетеродимерный интегрин $\alpha\beta 1$ (VLA-6) на поверхности NK-клеток периферической крови взаимодействует с ламинином, также регулируя миграцию NK-клеток [41]. Молекулы CD51 (интегрин $\alpha 5$) NK-клеток взаимодействуют с витронектином, фибронектином внеклеточного матрикса [82], что также позволяет предположить роль CD51 в миграции естественных киллеров.

Фенотипический рецептор CD56, экспрессированный в том числе на NK-клетках, также известен как невральная молекула межклеточной адгезии (NCAM-1). Молекулы CD56 также могут встречаться во внеклеточном матриксе, обеспечивая гомофильное адгезионное взаимодействие с CD56⁺ клетками [131]. NK-клетки также могут экспрессировать CD44, рецептор, участвующий в реализации цитотоксичности естественных киллеров [128]. Обычно его лигандом является гиалуриновая кислота, однако молекула также способна к взаимодействию CD11a [88].

В таблице 2 собраны данные о лиганд-рецепторных взаимодействиях NK-клеток и клеток трофобласта с компонентами внеклеточного матрикса.

Таким образом, контактные взаимодействия клеток трофобласта и NK-клеток являются важным регулятором функций обоих типов клеток. Рецепторы, расположенные на поверхности

клеток, также обеспечивают взаимодействие с компонентами ВМ. Также NK-клетки и клетки трофобласта могут осуществлять взаимную регуляцию за счет секреции растворимых веществ.

Дистантные взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта

Клетки синцитиотрофобласта, цитотрофобласта, вневорсинчатого трофобласта и децидуальные NK-клетки секретируют CXCL12 – гомеостатический хемокин, также известный как SDF-1 (от англ. stromal cell-derived factor-1 – фактор стромальных клеток 1) [49, 127, 157, 165]. Способность клеток к делению при добавлении рекомбинантного хемокина увеличивается, однако добавление антител против CXCL12 и его рецепторов – CXCR4 и CXCR7, приводит к снижению активности деления клеток. Показано, что после обработки CXCL12 клетки существенно снижали скорость апоптоза, которая снова возрастала после добавления антител к CXCL12, CXCR4 и CXCR7. Этот факт позволяет предположить антиапоптотическую функцию SDF-1 [77]. За счет секреции CXCL12 клетки трофобласта влияют на миграцию NK-клеток [49]. Показано, что взаимодействие NK-клеток периферической крови с рекомбинантным CXCL12 вызывает миграцию NK-клеток, в то время как блокировка CXCR4 приводит к неспособности NK-клеток к миграции. Блокировка взаимодействия CXCL12/CXCR4 вызывает увеличение экспрессии активирующих рецепторов CD16 и NKp44 на NK-клетках периферической крови, совместно культивируемых с клетками трофобласта. Экспрессия ингибирующего рецептора KIR2DL1 на NK-клетках периферической крови снижается после культивирования в присутствии клеток трофобласта. Кроме того, обработка ингибиторами CXCL12/CXCR4 приводит к повышению экспрессии перфорина, а следовательно, приводит к усилению цитотоксических свойств [107]. Таким образом, CXCL12, секретируемый клетками трофобласта, не только участвует в процессах привлечения NK-клеток в матку, но и регулирует формирование толерантности к клеткам плода.

Клетки трофобласта синтезируют CXCL16, чьи рецепторы CXCR16 присутствуют на поверхности макрофагов и в небольшом количестве на NK-клетках [150]. В присутствии обработанных рекомбинантным человеческим CXCL16 макрофагом цитотоксичность NK-клеток, полученных из периферической крови, ослабляется. CXCL16 снижает экспрессию макрофагами IL-15, играющего важную роль в дифференцировке, созревании и выживании NK-клеток, а также стимулирующего цитотоксическую активность NK-клеток *in vitro* [31, 91].

ТАБЛИЦА 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА И НК-КЛЕТОК С КОМПОНЕНТАМИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

TABLE 2. INTERACTION OF TROPHOBLAST CELLS AND NK CELLS WITH COMPONENTS OF THE EXTRACELLULAR MATRIX

Компонент ВМ ECM component	Рецептор клеток трофобласта, связывающий компонент ВМ Trophoblast cell receptor that binds the BM component	Сигнальный путь, активируемый при взаимодействии Interaction-activated signaling pathway	Рецептор НК-клеток, связывающий компонент ВМ Interaction-activated signaling pathway	Сигнальный путь, активируемый при взаимодействии Interaction-activated signaling pathway
Фибронектин Fibronectin	CD49e (интегрин $\alpha 5\beta 1$) [2, 68, 148, 166] CD49e ($\alpha 5\beta 1$ integrin) [2, 68, 148, 166]	Нет данных No data	CD51 (интегрин $\alpha v5$) [82] CD51 (integrin $\alpha v5$) [82]	Нет данных No data
Витронектин Vitronectin	CD61 (интегрин $\alpha v\beta 3$) [2, 68, 148, 166] CD61 (integrin $\alpha v\beta 3$) [2, 68, 148, 166]	Нет данных No data	CD51 (интегрин $\alpha v5$) [82] CD51 (integrin $\alpha v5$) [82]	Нет данных No data
Ламинин Laminin	CD61 (интегрин $\alpha v\beta 3$) [105] CD61 ($\alpha v\beta 3$ integrin) [105]	JNK PI3K/AKT (показано на placenta-derived multi-potent cells) [105] JNK PI3K/AKT (shown on placenta-derived multi-potent cells) [105]	–	–
Ламинин Laminin	Интегрин $\alpha 6\beta 4$ [2, 68, 148, 166] $\alpha 6\beta 4$ integrin [2, 68, 148, 166]	Нет данных No data	Интегрин $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6) [41] $\alpha 6\beta 1$ integrin (VLA-6) [41]	Нет данных No data
Ламинин Laminin	Интегрин $\alpha 1\beta 1$ [2, 68, 148, 166] $\alpha 1\beta 1$ integrin [2, 68, 148, 166]	Нет данных No data	–	–
Коллаген IV Collagen IV	Интегрин $\alpha 1\beta 1$ [2, 68, 148, 166] $\alpha 1\beta 1$ integrin [2, 68, 148, 166]	Нет данных No data	–	–
EMILIN1	Интегрин $\alpha 4\beta 1$ [2, 68, 148, 166] $\alpha 4\beta 1$ integrin [2, 68, 148, 166]	Нет данных No data	–	–
β -катенин β -catenin	CD324 (E-кадгерин), K-кадгерин [10] CD324 (E-cadherin), K-cadherin [10]	Нет данных No data	–	–
Фибронектин Fibronectin	Интегрин $\alpha 4\beta 1$ [2, 68, 148, 166] $\alpha 1\beta 1$ integrin [2, 68, 148, 166]	p38/MAPK (показано на клетках печени крыс) [28] p38/MAPK (shown in rat liver cells) [28]	CD49d (VLA-4), CD49e (VLA-5) [35, 130]	Нет данных No data

Клетки вневорсинчатого трофобласта экспрессируют IL-15. В экспериментальных условиях, цитокин усиливает инвазию клеток трофобласта, увеличивая экспрессию MMP-1 [129]. Рецептор IL-15 (IL-15R) состоит из α -субъединицы IL-15R и β - и γ -субъединиц IL-2R. Субъединица α IL15R, экспрессируемая на антиген-презентирующих клетках, участвует в представлении IL-15 NK-клеткам, которые экспрессируют как β -, так и γ -субъединицы IL-2R [103].

И клетки трофобласта, и NK-клетки синтезируют IL-8 [26]. На поверхности этих клеток также экспрессированы рецепторы IL-8 [20, 26]. Секретируемый NK-клетками IL-8, по-видимому, необходим для физиологического протекания беременности, так как снижение экспрессии IL-8 и его рецепторов в децидуальной оболочке коррелирует с повторяющимися выкидышами [109]. IL-8 стимулирует миграцию и инвазию клеток трофобласта, что может быть частично связано с увеличением секреции MMP-2 и MMP-9 и повышением экспрессии интегринов $\alpha 5$ и $\beta 1$ [61].

Провоспалительные цитокины IFN γ и TNF α являются важнейшими цитокинами, продуцируемыми NK-клетками и регулируемыми их цитотоксические свойства [146]. IFN γ также синтезируется клетками трофобласта. На поверхности клеток трофобласта экспрессирован IFN γ R [106]. IFN γ оказывает ингибирующее воздействие на клетки трофобласта, снижая способность к инвазии, что может быть вызвано сниженной продукцией MMP-2. Установлено также, что цитокин индуцирует апоптоз клеток трофобласта [67]. Рецептор к TNF α обнаруживается на NK-клетках и клетках трофобласта [70, 87]. Цитокин оказывает проинвазивное воздействие на клетки трофобласта, стимулируя секрецию MMP-9 [70].

Клетки вневорсинчатого трофобласта и NK-клетки синтезируют RANTES [37, 48]. Его рецептор CCR5 также обнаружен и на клетках трофобласта [83], и на NK-клетках [151]. RANTES стимулирует миграцию и инвазию клеток трофобласта, что может объясняться его способностью повышать экспрессию интегрин $\beta 1$ в клетках трофобласта [37]. NK-клетки в ответ на RANTES пролиферируют и мигрируют, что становится невозможным в отсутствие CCR5 [151].

Клетки трофобласта также секретируют IL-6. Его взаимодействие с IL-6R на поверхности клеток трофобласта приводит к увеличению секреции гормонов плаценты [98]. NK-клетки также являются чувствительными к IL-6. Цитокин вызывает усиление цитотоксических свойств посредством связывания с IL-6R на поверхности NK-клеток [79].

На ранних этапах беременности dNK-клетки являются источником IL-1 β [122]. Клетки тро-

фобласта экспрессируют IL-1R1, специфично связывающий IL-1 β [112]. Цитокин предположительно задействован в положительной регуляции миграции клеток трофобласта [112]. Также IL-1 β может синтезироваться самими клетками трофобласта, причем наибольшая концентрация наблюдается на ранних этапах беременности и позже снижается. Установлено, что секреция MMP-9 клетками трофобласта увеличивается под действием IL-1 β , что указывает на роль цитокина в регуляции инвазии [75].

NK-клетки и клетки трофобласта могут синтезировать противовоспалительный цитокин IL-10 [21, 117] и его рецептор IL-10R [118, 169]. IL-10 может усиливать цитотоксический потенциал естественных киллеров, стимулировать пролиферацию клеток, а также индуцировать синтез IFN γ [14]. Также цитокин может вызывать экспрессию HLA-G на поверхности клеток трофобласта, что приводит к обеспечению иммунной толерантности [94]. В то же время IL-10 оказывает антиинвазивное воздействие на клетки трофобласта, снижая продукцию MMP-9 [118].

Белки семейства FGF (от англ. fibroblast growth factor – фактор роста фибробластов) и их рецепторы синтезируются клетками трофобласта млекопитающих [33, 132, 164]. Цитокины могут участвовать в регуляции взаимодействия клеток трофобласта с внеклеточным матриксом [46, 97]. Клетки вневорсинчатого и ворсинчатого трофобласта, а также децидуальные NK-клетки экспрессируют GM-CSF [96, 122]. Его рецептор обнаружен на клетках трофобласта [60]. Цитокин усиливает активность MMP-2 и секрецию VEGF у клеток линий JEG-3 и Sw.71, воспроизводящих свойства клеток трофобласта [38, 86].

Децидуальные NK-клетки продуцируют VEGF [165]. Клетки синцитиотрофобласта на протяжении первого триместра беременности экспрессируют VEGFR-1. Отмечено, что в случае привычной потери беременности трофобласт демонстрирует сниженное количество рецепторов VEGF [126]. Во время внутриутробного развития VEGF участвует в процессе имплантации, регулируя рост и формирование сосудов на границе маточно-плацентарного контакта [165]. Показано, что VEGF также способствует приобретению вневорсинчатым трофобластом эндотелиального фенотипа, характеризующегося повышенной экспрессией CD56 (NCAM), VE-кадгерина и интегрин- $\beta 1$ и сниженной экспрессией E-кадгерина. В результате этих изменений *in vitro* происходит успешное встраивание трофобласта в экспериментальную модель сосуда – трубкоподобные структуры, образованные эндотелиальными клетками [3].

Как клетки трофобласта, так и NK-клетки синтезируют белки суперсемейства TGF- β (от англ. transforming growth factor β – трансформирующий ростовой фактор β) [59, 73]. Рецепторы к TGF- β также экспрессированы на поверхности клеток трофобласта и NK-клеток [73]. TGF- β оказывает ингибирующее действие на NK-клетки, снижая их цитотоксичность [29]. Также цитокин оказывает антиинвазивное воздействие на клетки трофобласта, что опосредуется снижением концентрации MMP-9 [66]. Однако имеются и противоположные данные: TGF- β может повышать уровень экспрессии MMP-9, что положительно сказывается на инвазивной способности клеток трофобласта [54].

Децидуальные NK-клетки синтезируют LIF (от англ. leukemia inhibitory factor – ингибирующий фактор лейкемии) [122], клетки трофобласта экспрессируют LIFR. Цитокин положительно влияет на инвазивную активность клеток трофобласта [110].

В таблице 3 собраны данные о цитокинах, синтезируемых NK-клетками и клетками трофобласта и их рецепторах.

Таким образом, как NK-клетки, так и клетки трофобласта являются продуцентами различных цитокинов, как про-, так и противовоспалительных, а также ростовых факторов и хемокинов. Подобный широкий профиль секреции определяет дистантное взаимодействие NK-клеток и клеток трофобласта и обеспечивает контроль инвазии клеток трофобласта в стенку матки. За счет связывания рецепторов и воздействия цитокинов в клетках могут активироваться многие сигнальные пути.

Транскрипционная регуляция NK-клеток клетками трофобласта

Взаимодействие NK-клеток и клеток трофобласта вызывает запуск различных сигнальных каскадов в этих клетках, что приводит к изменению их функций. В таблицах 1, 2 и 4 представлены данные о сигнальных путях, активируемых в результате лиганд-рецепторных взаимодействий NK-клеток и клеток трофобласта.

Подробнее мы рассмотрим сигнальные пути с участием митоген-активированных киназ (MAPK), белков STAT и белковых комплексов SMAD.

Белки MAPK (от англ. mitogen-activated protein kinase) – серин-треониновые киназы, способные регулировать эффекторные функции клеток иммунной системы. Сигнальная система с участием этих киназ представляет собой каскад, передающий сигнал через последовательную активацию нескольких «уровней» протеинкиназ: MAP4K, MAP3K, MAP2K, MAPK, MAPKAPK. Первые три киназы являются обязательными элемента-

ми, а участие двух последних варьирует в зависимости от клеток и стимулов. У млекопитающих выделяют четыре основных MAPK-сигнальных пути: ERK1/2 (от англ. extracellular signal-regulated kinase), JNK (от англ. c-Jun N-terminal kinase), p38 и ERK5 [45]. MAPK-пути, особенно через активацию ERK, регулируют пролиферацию и развитие NK-клеток [44]. Обработка ингибиторами сигнальных путей JNK1/2/MAPK и ERK/MAPK может снижать активность NK-клеток при культивировании с клетками трофобласта, что указывает на важность сигнального пути MAPK в функциональной регуляции NK-клеток [107]. В клетках линии NK-92 в присутствии клеточной линии трофобласта Sw.71 снижено фосфорилирование ERK и JNK по сравнению с контрольными клетками [103]. Сигнальные пути ERK/MAPK и JNK/MAPK могут активироваться в клетках трофобласта и NK-клетках при взаимодействии CXCL12/CXCR4, TNF α /TNFR, TGF/TGFR и LAF/LIFR (табл. 4).

Белки STAT являются цитоплазматическими факторами, активируются фосфорилированием тирозина в ответ на действие цитокинов либо факторов роста [143]. Семейство STAT включает в себя семь структурно и функционально связанных белков: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a и STAT5b, а также STAT6. Семейство JAK в клетках млекопитающих представлено белками TYK2, JAK1, JAK2 и JAK [141]. Как упоминалось ранее, IL-15 необходим для созревания, дифференцировки, пролиферации и реализации эффекторных функций NK-клеток [60]. NK-клетки активируются IL-15, транспрезентированным на рецепторе IL-15, экспрессированном на поверхности дендритных клеток [78]. Показано, что клетки трофобласта посредством негативной регуляции экспрессии транскрипционных факторов, усиливающих действие IL-15, способны снижать цитотоксичность NK-клеток. Две субъединицы IL-15R – β и γ , инициируют сигналинг посредством киназ JAK1, JAK3 и белка STAT5 [144]. Также белки STAT в клетках трофобласта активируются при взаимодействии IFN γ /IFN γ R, RANTES/CCR5, IL-10/IL-10R, FGF/FGFR, GM-CSF/GM-CSFR, LIF/LIFR. В NK-клетках этот процесс происходит при взаимодействии RANTES/CCR5, IL-10/IL-10R, GM-CSF/GM-CSFR (табл. 4).

Мишень иммунодепрессанта рапамицина млекопитающих (от англ. mammalian target of rapamycin – mTOR) – серин/треониновая киназа семейства PI3K-ассоциированных киназ (от англ. phosphatidylinositol 3-kinases – фосфатидилинозитол 3-киназы). Белок участвует в регуляции обмена веществ, оказывая влияние на организм человека, в том числе иммунную систе-

ТАБЛИЦА 3. ЦИТОКИНЫ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ НК-КЛЕТКАМИ И КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА, И ИХ РЕЦЕПТОРЫ НА КЛЕТКАХ ТРОФОБЛАСТА И НК-КЛЕТКАХ

TABLE 3. CYTOKINES SYNTHESIZED BY NK CELLS AND TROPHOBLAST CELLS AND THEIR RECEPTORS ON TROPHOBLAST CELLS AND NK CELLS

Источник цитокина Cytokine source	Рецептор на поверхности клетки Cell surface receptor	
НК-клетка NK cell	Трофобласт Trophoblast cell	НК-клетка NK cell
CXCL12 [165]	CXCR4 [157]	CXCR4 [49]
IL-8 [26]	IL-8R [26]	IL-8R [20]
IFN γ [146]	IFN γ R [106]	Нет данных No data
TNF α [146]	TNF α R [70]	TNF α R [87]
RANTES [37]	CCR5 [83]	CCR5 [151]
IL-1 β [122]	IL-1R [112]	Нет данных No data
IL-10 [21]	IL-10R [118]	IL-10R [169]
GM-CSF [122]	GM-CSFR [60]	Нет данных No data
VEGF [165]	VEGFR-1 [126]	Нет данных No data
TGF- β [59]	TGF- β R [73]	TGF- β R [73]
LIF [122]	LIFR [1]	Нет данных No data
Трофобласт Trophoblast cell	НК-клетка NK cell	Трофобласт Trophoblast cell
CXCL12 [49]	CXCR4 [49]	CXCR4 [157]
CXCL16 [150]	CXCR16 [150]	Нет данных No data
IL-15 [103]	IL-2R [103]	Нет данных No data
IL-8 [26]	IL-8R [20]	IL-8R [26]
RANTES [37]	CCR5 [151]	CCR5 [83]
IL-6 [98]	IL-6R	IL-6R
IL-1 β [75]	Нет данных No data	IL-1R
FGF [33, 132, 164]	Нет данных No data	FGF [33, 132, 164]
IL-10 [117]	IL-10R [169]	IL-10R [118]
GM-CSF [96]	Нет данных No data	GM-CSFR [60]
TGF- β [73]	TGF- β R [73]	TGF- β R [73]

ТАБЛИЦА 4. ВОЗМОЖНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА И НК-КЛЕТОК И АКТИВИРУЕМЫЕ ЭТИМИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯМИ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

TABLE 4. POSSIBLE INTERACTIONS BETWEEN TROPHOBLAST CELLS AND NK CELLS, AND SIGNALING PATHWAYS ACTIVATED BY THESE INTERACTIONS

Цитокин Cytokine	Рецептор Receptor	Эффект Effect	Сигнальные пути Signaling pathways
CXCL12	CXCR4, CXCR7	Миграция НК-клеток [49], снижение их цитотоксических свойств [107] Migration of NK cells [49], decrease in their cytotoxic properties [107]	ERK/MAPK (показано на НК-клетках периферической крови) [107] ERK/MAPK (shown on peripheral blood NK cells) [107]
CXCL16	CXCR16	Снижение цитотоксических свойств НК-клеток [31] Decreased cytotoxic properties of NK cells [31]	PI3K/AKT (показано на стромальных клетках эндометрия) [89] PI3K/AKT (shown on endometrial stromal cells) [89]
IL-15	IL-2R	Созревание, дифференцировка, пролиферация НК-клеток [91] Maturation, differentiation, proliferation of NK cells [91]	mTOR (показано на НК-клетках периферической крови) [85] JAK/STAT (показано на клеточной линии NK-92) [103] mTOR (shown on peripheral blood NK cells) [85] JAK/STAT (shown in NK-92 cell line) [103]
IL-8	IL-8R	Стимуляция миграции и инвазии клеток трофобласта [61], поддержание физиологической беременности [109] Stimulation of migration and invasion of trophoblast cells [61], maintenance of physiological pregnancy [109]	Нет данных No data
IFNγ	IFN γ R	Усиление цитотоксических свойств НК-клеток [146], снижение уровня инвазии и жизнеспособности клеток трофобласта [67] Enhancement of cytotoxic properties of NK cells [146], decrease in the level of invasion and viability of trophoblast cells [67]	JAK/STAT (показано на клеточных линиях JEG3, BeWo) [9, 19] (shown on JEG-3, BeWo cell lines) [9, 19]
TNFα	TNFR	Регуляция цитотоксичности НК-клеток [146], стимуляция инвазии клеток трофобласта [70] Regulation of NK cell cytotoxicity [146], stimulation of trophoblast cell invasion [70]	MAPK (показано на первичных клетках трофобласта человека) [70], NF-κB (показано на первичных клетках трофобласта человека) [70] MAPK (shown on primary human trophoblast cells) [70], NF- κ B (shown on primary human trophoblast cells) [70]
RANTES	CCR5	Стимуляция миграции и инвазии клеток трофобласта [37], миграция НК-клеток [151] Stimulation of migration and invasion of trophoblast cells [37], migration of NK cells [151]	JAK/STAT, MAPK (p38), (показано на Т-клетках) [155] JAK/STAT, MAPK (p38), (shown on T cells) [155]
IL-6	IL-6R	Регуляция эндокринной функции плаценты [98], усиление цитотоксических свойств НК-клеток [79] Regulation of the endocrine function of the placenta [98], enhancement of the cytotoxic properties of NK cells [79]	JAK/STAT3 (показано на НК-клетках периферической крови) [156] JAK/STAT3 (shown in peripheral blood NK cells) [156]

Таблица 4 (окончание)
Table 4 (continued)

Цитокин Cytokine	Рецептор Receptor	Эффект Effect	Сигнальные пути Signaling pathways
IL-1 β	IL-1R	Регуляции миграции и инвазии клеток трофобласта [75, 112] Regulation of migration and invasion of trophoblast cells [75, 112]	Wnt5a/RhoA/JNK (показано на предшественниках корковых нейронов) Wnt5a/RhoA/JNK (shown on progenitors of cortical neurons) [102]
FGF	FGFR	Регуляция взаимодействия клеток трофобласта с внеклеточным матриксом [46, 97] Regulation of the interaction of trophoblast cells with the extracellular matrix [46, 97]	RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT, STAT [138]
IL-10	IL-10R	Регуляция цитотоксичности и стимуляция пролиферации НК-клеток [14], индуцирование экспрессии HLA-G клетками трофобласта [94], снижение инвазивной способности клеток трофобласта [118] Regulation of cytotoxicity and stimulation of NK cell proliferation [14], induction of HLA-G expression by trophoblast cells [94], reduction of the invasive ability of trophoblast cells [118]	JAK/STAT (показано на клетках линии RAW264.7) [115] PI3K (показано на клетках линии J774 и на первичных нейронах) [76, 101] JAK/STAT (shown on RAW264.7 cells) [115] PI3K (shown on J774 cells and primary neurons) [76, 101]
GM-CSF	GM-CSFR	Усиление инвазии клеток трофобласта и повышение синтеза VEGF [38] Increased invasion of trophoblast cells and increased synthesis of VEGF [38]	JAK/STAT (показано на клеточной линии JEG3) [86], MAPK/ERK (показано на клеточных линиях Swan 71, JEG3) [38, 86], PI3K/Akt (показано на клеточной линии Swan 71) [38] JAK/STAT (shown in JEG3 cell line) [86], MAPK/ERK (shown on cell lines Swan 71, JEG3) [38, 86], PI3K/Akt (shown in Swan 71 cell line) [86]
VEGF	VEGFR	Регуляция инвазии клеток трофобласта [3, 126] Regulation of trophoblast cell invasion [3, 126]	PI3K/Akt (показано на звездчатых клетках печени) [133] PI3K/Akt (shown on liver stellate cells) [133]
TGF- β	TGF- β R	Снижение цитотоксичности НК-клеток [29], регуляция инвазивной способности клеток трофобласта [54, 66] Decreased cytotoxicity of NK cells [29], regulation of the invasive ability of trophoblast cells [54, 66]	SMAD (JEG-3) [54], MAPK/ERK (показано на эпителиальных клетках, фибробластах, клетках рака груди), PI3K/Akt (показано на эпителиальных и эндотелиальных клетках, фибробластах) [168] SMAD (JEG-3) [54], MAPK/ERK (shown on epithelial cells, fibroblasts, breast cancer cells), PI3K/Akt (shown on epithelial and endothelial cells, fibroblasts) [168]
LIF	LIFR	Регуляция инвазии клеток трофобласта [110] Regulation of trophoblast cell invasion [110]	JAK/STAT (показано на клеточной линии JEG3) [110], MAPK/ERK (показано на клеточной линии HTR-8/SVneo) [111] JAK/STAT (shown in JEG3 cell line) [110], MAPK/ERK (shown in the HTR-8/SVneo cell line) [111]

му [125]. Повышенные концентрации IL-15 вызывают активацию mTOR в NK-клетках, вызывая усиление их цитотоксических свойств путем увеличения интенсивности обмена веществ [85]. Показано, что TGF- β , секретируемый клетками трофобласта, вызывает ингибирование mTOR в NK-клетках, обработанных IL-15, в то время как добавление антител, блокирующих TGF- β , вызывает обратный эффект [142].

Сигнальный путь SMAD является важным посредником в реализации функций TGF- β . Белки SMAD классифицируют в 3 группы: рецептор-регулируемые SMAD (R-SMAD) к которым относят SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 и SMAD8, общий SMAD (Co-SMAD) – SMAD4 и ингибирующие SMAD (I-SMADS) – SMAD6 и SMAD7 [161]. SMAD белки, опосредующие передачу сигнала от TGF- β , экспрессированы клетками вневорсинчатого трофобласта, синцитиотрофобласта, цитотрофобласта, обнаружены в клетках децидуальной оболочки [51, 73]. TGF- β 1 осуществляет фосфорилирование SMAD2/3 через рецепторную тирозинкиназу ALK5, либо через ALK4 [72]. Показано, что TGF- β 1 оказывает анти-инвазивное действие на клетки трофобласта [73].

Таким образом, взаимная регуляция NK-клеток и клеток трофобласта осуществляется как посредством контактных, так и дистантных взаимодействий, что приводит к модулированию функций клеток с участием различных сигнальных путей. Нарушение взаимодействий NK-клеток и клеток трофобласта может приводить к патологиям беременности. Возможным способом коррекции этих взаимодействий может быть регуляция молекулярных механизмов, вовлеченных в процессы транскрипции и трансляции. Одним из возможных подходов является применение ингибиторов циклинзависимых киназ.

Транскрипционная регуляция клеток иммунной системы с участием комплекса киназ CDK8/19

Характеристика комплекса киназ CDK8/19

Циклинзависимые киназы (от англ. cyclin-dependent kinases – CDK) – это серин/треониновые протеинкиназы, которые осуществляют свою ферментативную активность после связывания субъединицы белка-активатора – циклина. CDK делятся на две подгруппы, исходя из их функционального назначения: CDK клеточного цикла (CDK1, CDK4 и CDK5) и транскрипционные киназы (CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 и CDK20) [84]. Среди транскрипционных протеинкиназ наиболее изученными являются CDK7, CDK8/19 и CDK9. Одной из наиболее важных функций этих киназ является фосфорилирование С-концевого домена РНК-полимеразы II,

что определяет регуляцию инициации транскрипции, элонгации и процессинга РНК.

Циклин-зависимые киназы CDK8 образуют комплексы, содержащие саму киназу, циклин-С (CYCC) и пару белков MED12 и MED13/MED12L и MED13L [5], формируя так называемый киназный модуль. Паралог CDK8–CDK19, был идентифицирован посредством масс-спектрометрии [124]. Оба белка имеют высокую степень схожести последовательности в своих киназном и циклин-связывающем доменах. Однако киназы отличны в своих С-концевых участках, что предполагает возможные различия в их регуляторных активностях [24]. Подобно CDK8, CDK19 образует аналогичный комплекс CDK19, CYCC, MED12 и MED13 [23]. Гомология паралога MED12 и MED13 составляет 59% и 53% соответственно [71]. MED12L и MED13L взаимоисключающим образом ассоциируются с MED12 и MED13, и их потенциальные функциональные различия остаются неясными. Различные модули киназы специфичны для разных типов клеток: MED12 и MED13 экспрессируются повсеместно, тогда как MED13L в основном экспрессируется в тканях мозга и сердца, а MED12L в основном экспрессируется в головном мозге. Экспрессия CDK19 установлена в предстательной железе, слюнных железах, яичке и вилочковой железе [136]. Нокаутные по CDK8 мыши оказываются нежизнеспособны на ранних этапах эмбриогенеза, в отличие от мышей, нокаутных по CDK19 [152]. Однако существуют данные, что CDK8 и CDK19, по-видимому, экспрессируются повсеместно. MED12 взаимодействует с ДНК-связанными факторами транскрипции и, следовательно, действует как центр для связи этих факторов с субъединицей киназы и основным медиаторным комплексом (далее – Медиатор).

Медиаторы млекопитающих представляют собой большие белковые комплексы, содержащие до 30 различных субъединиц, которые играют решающую роль в передаче сигналов от факторов транскрипции к базальному аппарату транскрипции. Он сам является частью комплекса предварительной инициации и участвует в регуляции транскрипции [64]. Медиатор функционирует как коммутатор, передавая сигналы от геноспецифичных регуляторных белков к РНК-полимеразе II, чтобы регулировать инициацию и элонгацию транскрипции. Медиатор также участвует в других клеточных процессах, таких как сворачивание и запетливание хроматина, а также регуляция экспрессии генов путем взаимодействия с некодирующей РНК (нкРНК) [6]. Его структурной особенностью является наличие головного, центрального и хвостового модулей (рис. 1).

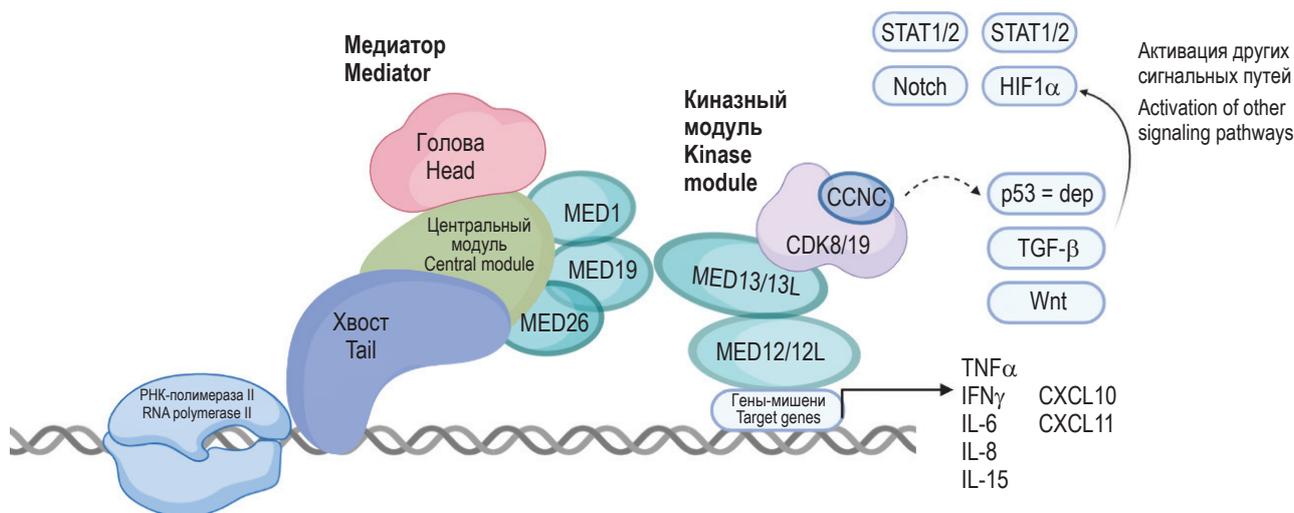


Рисунок 1. НК-клетки – новая экспериментальная система для изучения механизмов транскрипционной регуляции Медиаторного комплекса

Примечание. Ядро медиаторного комплекса состоит из головного, центрального и хвостового модулей.

Субъединицы MED1, MED19 и MED26 центрального модуля связаны с киназным модулем через MED13/13L. Киназный модуль образован циклином C (CCNC), стабилизирующим циклинзависимые киназы 8 и 19 (CDK8/19). CDK8/19 может участвовать в фосфорилировании ряда транскрипционных факторов, таких как трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), p53 и Wnt, таким образом регулируя активность сигнальных путей в НК-клетках. Взаимодействие Медиаторного комплекса с хроматином, некодирующими РНК, а также транскрипционными факторами осуществляется через MED12/12L. Таким образом, Медиатор участвует в регуляции генной экспрессии ряда функциональных факторов НК-клеток, включая фактор некроза опухоли-альфа (TNFα), интерферон гамма (IFNγ), IL-6, IL-8, IL-15 и другие цитокины.

Figure 1. NK cells – a new experimental system for studying the mechanisms of transcriptional regulation of the mediator complex
Note. The core of the mediator complex consists of head, central and tail modules.

The MED1, MED19 and MED26 subunits of the central module are linked to the kinase module via MED13/13L. The kinase module is formed by cyclin C (CCNC), which stabilizes cyclin-dependent kinases 8 and 19 (CDK8/19). CDK8/19 may be involved in the phosphorylation of a number of transcription factors such as transforming growth factor beta (TGF-β), p53 and Wnt, thus regulating the activity of signaling pathways in NK cells. Interaction of the Mediator Complex with chromatin, non-coding RNA, and transcription factors is carried out through MED12/12L. Thus, the Mediator is involved in the regulation of gene expression of a number of functional factors of NK cells, including tumor necrosis factor-alpha (TNFα), interferon gamma (IFNγ), IL-6, IL-8, IL-15 and other cytokines.

Ассоциация модуля CDK8 с медиатором обратима, но стабильна, и осуществляется через MED13 и неопределенный набор субъединиц медиатора. Считается, что CDK8 играет роль в тонкой настройке транскрипции и может оказывать как репрессивное, так и активирующее влияние на экспрессию генов, регулируемых медиатором [17]. Кроме того, CDK8 участвует в транскрипции не только путем фосфорилирования непосредственно РНК-полимеразы, но и связанных с ней последовательностей, кодирующих транскрипционные факторы [8]. Установлена онкогенная активность CDK8. Киназа вовлечена в регуляцию таких онкогенных путей как p53-зависимый, Wnt-катениновый, b-катениновый, TGF-β-зависимый путь. Сверхэкспрессия гена CDK8 была обнаружена при раке толстой кишки, что коррелирует с плохим прогнозом течения заболевания. Сверхэкспрес-

сия CDK8 выявлена также при раке молочной железы и раке яичников [39], при колоректальном раке [34]. Недавние исследования показали, что транскрипция CDK8 может быть подавлена специфичными микроРНК (miR-9), что в свою очередь подавляет пролиферацию клеток и усиливает их апоптоз [27]. Роль CDK19 в патогенезе онкологических заболеваниях изучена хуже. Сверхэкспрессия CDK19 обнаруживается при раке простаты и связана с увеличением вероятности возникновения метастаз [12]. Установлено, что у пациентов с микроцефалией, умственной отсталостью и врожденными дефектами сетчатки нарушена работа гена, кодирующего CDK19, что указывает на участие киназы в развитии нервной системы [95]. Ведутся разработки ингибиторов киназ CDK8, которые могут служить новой ветвью противоопухолевой терапии [158].

Таким образом, комплекс CDK8/19 является важным регулятором транскрипции, нарушение регуляции которого может привести к нарушению клеточного цикла, транскрипции или апоптозу. Однако повышенная экспрессия CDK8/19 может способствовать развитию ряда заболеваний, таких как злокачественные новообразования, нейродегенеративные заболевания.

Участие CDK8/19 во внутриклеточных сигнальных путях и возможные варианты коррекции функции клеток

Помимо прямой регуляции транскрипции за счет связывания с РНК-полимеразой II киназы CDK8/19 могут принимать участие в фосфорилировании факторов транскрипции. Например, показана связь CDK8/19 в регуляции сигнального пути NF-κB. Члены семейства транскрипционных факторов NF-κB вовлечены в механизмы воспалительных и онкологических заболеваний, вирусных инфекций [167]. Под контролем NF-κB находится экспрессия генов TNFα, IL-1, IL-6 и IL-8, а также молекул адгезии, опосредующих миграцию лейкоцитов к очагам воспаления. NF-κB также участвует в контроле васкуляризации [52, 159]. В настоящее время продемонстрировано, что при стимуляции TLR9 киназа CDK8/19, взаимодействуя с NF-κB, вызывает экспрессию генов медиаторов воспаления [163], а именно PTX3, CCL2, CCL3 и CCL4 [163].

Воздействие на комплекс CDK8/19 низкомолекулярными ингибиторами киназ или малыми РНК подавляет элонгацию NF-κB-индуцированной транскрипции [18]. CDK8/19 вместе с NF-κB связан с промоторами NF-κB-контролируемых генов. Обработка ингибиторами CDK8/19 приводит к снижению уровня фосфорилирования РНК-полимеразы II и подавлению движения полимеразы. Этот эффект ингибирования CDK8/19 специфичен для генов, индуцированных NF-κB, и не наблюдается с конститутивно экспрессированными генами [18]. При стимуляции клеточных линий HEK293 и HT1080 TNFα гетеродимеры NF-κB и CDK8/19 инициируют экспрессию генов раннего ответа NF-κB: IL-8, CXCL2 и хемоаттрактанта В-лимфоцитов – CXCL13 [18]. Ингибирование активности киназы CDK8/19 подавляет экспрессию NF-κB-целевых генов, но не приводит к снижению базового уровня экспрессии NF-κB-регулируемых генов [18].

Киназы CDK8/19 также вовлечены в STAT-зависимый сигналинг. В литературе описано, что в результате JAK-опосредованного фосфорилирования белков STAT1 происходит их димеризация и транспортировка транскрипционных факторов в ядро. Фосфорилирование сайта S727 STAT1 связано со снижением экспрессии гранзима В и перфорина НК-клетками и снижением

их активности [154]. Показано, что CDK8 конститутивно [113], а также в ответ на стимуляцию цитокинами, в том числе интерферонами, фосфорилирует белки STAT1 [8]. Более 40% всех чувствительных к IFNγ генов регулируются CDK8-опосредованным фосфорилированием STAT1 [8]. В двух различных исследованиях с использованием ингибиторов CDK8/19 показано снижение уровня фосфорилированного STAT1 в ответ на стимуляцию IFNγ [65, 104]. Однако в другом исследовании показано, что ингибирование CDK8 способствовало повышению цитотоксичности НК-клеток и повышению их противоопухолевой активности [154]. Применение ингибитора CDK8/19 увеличивало скорость реакции и выживаемость мышей, несущих ксенотрансплантаты меланомы и рака молочной железы. Обработка клеток линии NK-92MI ингибиторами комплекса CDK8/19 приводила к усилению цитотоксических свойств НК-клеток, повышенной выработке перфорина и гранзима В [53]. В целом можно говорить об участии CDK8/19 в регуляции в регуляции экспрессии генов, связанных с противовирусной активностью. Однако продолжительное ингибирование CDK8 может приводить к экспрессии ее паралога – CDK19. Так, в CDK8-нокаутных НК-клетках, после стимуляции IL-2 показана экспрессия белка CDK19 [154]. При ингибировании CDK8/19 может изменяться не только один, но и целый ряд процессов в клетке. Ингибирование CDK8/19 может влиять не только на опухолевые клетки, но и на другие типы функционально стабильных клеток, такие как фибробласты и иммунные клетки, в том числе НК-клетки.

Таким образом, циклинзависимые протеинкиназы CDK8 и CDK19 являются важными участниками сигнальных путей, которые в свою очередь определяют физиологическое функционирование всех клеток организма. Вопрос ингибирования CDK8/19 с помощью низкомолекулярных веществ в настоящее время активно изучается в плане разработки противоопухолевой терапии. Есть указания на то, что CDK8/19 могут выступать в качестве регулятора функций НК-клеток, однако молекулярные механизмы этой регуляции изучены неполностью.

Суммируя представленные в литературе данные, отметим, что при беременности в матке развивается «диалог» клеток трофобласта, имеющих плодовое происхождение, и материнских НК-клеток. За счет адгезионных рецепторов и рецепторов, опосредующих цитотоксичность, а также цитокинов, хемокинов и ростовых факторов НК-клетки регулируют инвазию клеток трофобласта. В то же время клетки трофобласта, секретировав цитокины, а также взаимодействия с элементами

внеклеточного матрикса, сдерживают активность НК-клеток, сохраняя, таким образом, способность к инвазии в стенку матки. Как контактные, так и дистантные механизмы взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта вызывают активацию различных внутриклеточных сигнальных путей. Нарушение «диалога» НК-клеток и клеток трофобласта может способствовать патологической инвазии трофобласта и, как следствие, приводить к изменению структуры плаценты и развитию патологий беременности. Одним из новых подходов к коррекции функций клеток, в том числе иммунных, является регуляция молекулярных механизмов, вовлеченных в процессы транскрипции и трансляции, а именно, влияние на белковые комплексы циклинзависимых про-

теинкиназ CDK8 и CDK19. Согласно представленным в литературе данным, CDK8/19 участвуют как непосредственно в регуляции активности РНК-полимеразы II, так и могут связываться с отдельными факторами транскрипции и элементами каскада внутриклеточного сигналинга. Однако данные об участии CDK8/19 в регуляции функциональной активности НК-клеток единичны. В настоящее время разрабатывают подходы к ингибированию активности CDK8/19, в том числе с целью получения селективной противоопухолевой терапии. Вклад CDK8/19 в биологию НК-клеток и влияние функциональной активности этих киназ на регуляцию взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта в настоящее время неоднозначен.

Список литературы / References

1. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «Конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник Российской академии медицинских наук, 2013. № 11. С. 12-21. [Ailamazian E.K., Stepanova O.I., Selkov S.A., Sokolov D.I. Cells of immune system of mother and trophoblast cells: constructive cooperation for the sake of achievement of the joint purpose. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, no. 11, pp. 12-21. (In Russ.)]
2. Adu-Gyamfi E.A., Czika A., Gorleku P.N., Ullah A., Panhwar Z., Ruan L.L., Ding Y.B., Wang Y.X. The involvement of cell adhesion molecules, tight junctions, and gap junctions in human placentation. *Reprod. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 2, pp. 305-320.
3. Aldo P.B., Krikun G., Visintin I., Lockwood C., Romero R., Mor G. A novel three-dimensional *in vitro* system to study trophoblast-endothelium cell interactions. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2007, Vol. 58, no. 2, pp. 98-110.
4. Alecsandru D., Garcia-Velasco J.A. Why natural killer cells are not enough: a further understanding of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen. *Fertil. Steril.*, 2017, Vol. 107, no. 6, pp. 1273-1278.
5. Allen B.L., Taatjes D.J. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 155-166.
6. Amoasii L., Olson E.N., Bassel-Duby R. Control of muscle metabolism by the mediator complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2018, Vol. 8, no. 2, a029843. doi: 10.1101/cshperspect.a029843.
7. Aplin J.D., Jones C.J., Harris L.K. Adhesion molecules in human trophoblast – a review. I. Villous trophoblast. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 4, pp. 293-298.
8. Bancerek J., Poss Z.C., Steinparzer I., Sedlyarov V., Pfaffenwimmer T., Mikulic I., Dolken L., Strobl B., Muller M., Taatjes D.J., Kovarik P. CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 2, pp. 250-262.
9. Barbosa B.F., Lopes-Maria J.B., Gomes A.O., Angeloni M.B., Castro A.S., Franco P.S., Fermino M.L., Roque-Barreira M.C., Ietta F., Martins-Filho O.A., Silva D.A., Mineo J.R., Ferro E.A. IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. *Biol. Reprod.*, 2015, Vol. 92, no. 3, 82. doi: 10.1095/biolreprod.114.124115.
10. Bellati F., Costanzi F., de Marco M.P., Cippitelli C., Stoppacciaro A., de Angelis C., Ruscito I., Rago R., Caserta D. Low endometrial beta-catenin and cadherins expression patterns are predictive for primary infertility and recurrent pregnancy loss. *Gynecol. Endocrinol.*, 2019, Vol. 35, no. 8, pp. 727-731.
11. Berman M.E., Xie Y., Muller W.A. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 156, no. 4, pp. 1515-1524.
12. Bragelmann J., Klumper N., Offermann A., von Massenhausen A., Bohm D., Deng M., Queisser A., Sanders C., Syring I., Merseburger A.S., Vogel W., Sievers E., Vlasic I., Carlsson J., Andren O., Brossart P., Duensing S., Svensson M.A., Shaikhibrahim Z., Kirfel J., Perner S. Pan-cancer analysis of the mediator complex transcriptome identifies CDK19 and CDK8 as therapeutic targets in advanced prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 7, pp. 1829-1840.
13. Brown L.M., Lacey H.A., Baker P.N., Crocker I.P. E-cadherin in the assessment of aberrant placental cytotrophoblast turnover in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Histochem. Cell. Biol.*, 2005, Vol. 124, no. 6, pp. 499-506.

14. Cai G., Kastelein R.A., Hunter C.A. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur. J. Immunol.*, 1999, Vol. 29, no. 9, pp. 2658-2665.
15. Cao G., Savani R.C., Fehrenbach M., Lyons C., Zhang L., Coukos G., Delisser H.M. Involvement of endothelial CD44 during *in vivo* angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2006, Vol. 169, no. 1, pp. 325-336.
16. Carter A.M., Enders A.C., Pijnenborg R. The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2015, Vol. 370, no. 1663, 20140070. doi: 10.1098/rstb.2014.0070.
17. Chan G., Strich R., Galbraith M., Dannappel M.V., Firestein R., Sooraj D., Loh J.J. Molecular and *in vivo* Functions of the CDK8 and CDK19 Kinase Modules. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019, Vol. 6, 171. doi: 10.3389/fcell.2018.00171.
18. Chen M., Liang J., Ji H., Yang Z., Altilia S., Hu B., Schronce A., McDermott M.S.J., Schools G.P., Lim C.U., Oliver D., Shtutman M.S., Lu T., Stark G.R., Porter D.C., Broude E.V., Roninson I.B. CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by NFkappaB. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 2017, Vol. 114, no. 38, pp. 10208-10213.
19. Choi J.C., Holtz R., Petroff M.G., Alfaiay N., Murphy S.P. Dampening of IFN-gamma-inducible gene expression in human choriocarcinoma cells is due to phosphatase-mediated inhibition of the JAK/STAT-1 pathway. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 3, pp. 1598-1607.
20. Chuntharapai A., Lee J., Hebert C.A., Kim K.J. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5682-5688.
21. Clark S.E., Burrack K.S., Jameson S.C., Hamilton S.E., Lenz L.L. NK cell IL-10 production requires IL-15 and IL-10 driven STAT3 Activation. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2087. doi: 10.3389/fimmu.2019.02087.
22. Crespo A.C., Mulik S., Dotiwala F., Ansara J.A., Sen Santara S., Ingersoll K., Ovies C., Junqueira C., Tilburgs T., Strominger J.L., Lieberman J. Decidual NK Cells Transfer Granulysin to Selectively Kill Bacteria in Trophoblasts. *Cell*, 2020, Vol. 182, no. 5, pp. 1125-1139.e18.
23. Daniels D.L., Ford M., Schwinn M.K., Benink H., Galbraith M.D., Amunugama R., Urh M. Mutual exclusivity of MED12/MED12L, MED13/13L, and CDK8/19 paralogs revealed within the CDK-mediator kinase module. *J. Proteomics Bioinform.*, 2013, Vol. 2, 004. doi: 10.4172/jpb.S2-004.
24. Dannappel M.V., Sooraj D., Loh J.J., Firestein R. Molecular and *in vivo* functions of the CDK8 and CDK19 kinase modules. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 6, 171. doi: 10.3389/fcell.2018.00171.
25. Das M., Zhu C., Kuchroo V.K. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 276, no. 1, pp. 97-111.
26. De Oliveira L.G., Lash G.E., Murray-Dunning C., Bulmer J.N., Innes B.A., Searle R.F., Sass N., Robson S.C. Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. *Placenta*, 2010, Vol. 31, no. 7, pp. 595-601.
27. Dou P., Tan G., Fan Z., Xiao J., Shi C., Lin Z. MicroRNA-9 facilitates hypoxia-induced injury and apoptosis in H9c2 cells via targeting CDK8. *J. Biosci.*, 2021, Vol. 46, 16.
28. Duarte S., Shen X.D., Fondevila C., Busuttill R.W., Coito A.J. Fibronectin-alpha4beta1 interactions in hepatic cold ischemia and reperfusion injury: regulation of MMP-9 and MT1-MMP via the p38 MAPK pathway. *Am. J. Transplant.*, 2012, Vol. 12, no. 10, pp. 2689-2699.
29. Eriksson M., Meadows S.K., Wira C.R., Sentman C.L. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, Vol. 76, no. 3, pp. 667-675.
30. Ewen E.M., Pahl J.H.W., Miller M., Watzl C., Cerwenka A. KIR downregulation by IL-12/15/18 unleashes human NK cells from KIR/HLA-I inhibition and enhances killing of tumor cells. *Eur. J. Immunol.*, 2018, Vol. 48, no. 2, pp. 355-365.
31. Fan D.X., Zhou W.J., Jin L.P., Li M.Q., Xu X.H., Xu C.J. Trophoblast-derived CXCL16 decreased granzyme B production of decidual gammadelta T cells and promoted Bcl-xL expression of trophoblasts. *Reprod. Sci.*, 2019, Vol. 26, no. 4, pp. 532-542.
32. Feng Y., Ma X., Deng L., Yao B., Xiong Y., Wu Y., Wang L., Ma Q., Ma F. Role of selectins and their ligands in human implantation stage. *Glycobiology*, 2017, Vol. 27, no. 5, pp. 385-391.
33. Ferriani R.A., Ahmed A., Sharkey A., Smith S.K. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors*, 1994, Vol. 10, no. 4, pp. 259-268.
34. Firestein R., Bass A.J., Kim S.Y., Dunn I.F., Silver S.J., Guney I., Freed E., Ligon A.H., Vena N., Ogino S., Chheda M.G., Tamayo P., Finn S., Shrestha Y., Boehm J.S., Jain S., Bojarski E., Mermel C., Barretina J., Chan J.A., Baselga J., Taberero J., Root D.E., Fuchs C.S., Loda M., Shivdasani R.A., Meyerson M., Hahn W.C. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature*, 2008, Vol. 455, no. 7212, pp. 547-551.
35. Fogler W.E., Volker K., McCormick K.L., Watanabe M., Ortaldo J.R., Wiltrot R.H. NK cell infiltration into lung, liver, and subcutaneous B16 melanoma is mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 156, no. 12, pp. 4707-4714.
36. Frey M., Packianathan N.B., Fehniger T.A., Ross M.E., Wang W.C., Stewart C.C., Caligiuri M.A., Evans S.S. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 1, pp. 400-408.

37. Fujiwara H., Higuchi T., Sato Y., Nishioka Y., Zeng B.X., Yoshioka S., Tatsumi K., Ueda M., Maeda M. Regulation of human extravillous trophoblast function by membrane-bound peptidases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, Vol. 1751, no. 1, pp. 26-32.
38. Furmento V.A., Marino J., Blank V.C., Roguin L.P. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) upregulates metalloproteinase-2 and VEGF through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells. *Placenta*, 2014, Vol. 35, no. 11, pp. 937-946.
39. Galbraith M.D., Donner A.J., Espinosa J.M. CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 4-12.
40. Ghadially H., Brown L., Lloyd C., Lewis L., Lewis A., Dillon J., Sainson R., Jovanovic J., Tigue N.J., Bannister D., Bamber L., Valge-Archer V., Wilkinson R.W. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br. J. Cancer*, 2017, Vol. 116, no. 9, pp. 1208-1217.
41. Gismondi A., Mainiero F., Morrone S., Palmieri G., Piccoli M., Frati L., Santoni A. Triggering through CD16 or phorbol esters enhances adhesion of NK cells to laminin via very late antigen 6. *J. Exp. Med.*, 1992, Vol. 176, no. 5, pp. 1251-1257.
42. Gonen-Gross T., Goldman-Wohl D., Huppertz B., Lankry D., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Hamani Y., Gilad R., Yagel S., Mandelboim O. Inhibitory NK receptor recognition of HLA-G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 1, e8941. doi: 10.1371/journal.pone.0008941.
43. Groten T., Gebhard N., Kreienberg R., Schleussner E., Reister F., Huppertz B. Differential expression of VE-cadherin and VEGFR2 in placental syncytiotrophoblast during preeclampsia – New perspectives to explain the pathophysiology. *Placenta*, 2010, Vol. 31, no. 4, pp. 339-343.
44. Guo H., Samarakoon A., Vanhaesebroeck B., Malarkannan S. The p110 delta of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 10, pp. 2419-2435.
45. Guo Y.J., Pan W.W., Liu S.B., Shen Z.F., Xu Y., Hu L.L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.*, 2020, Vol. 19, no. 3, pp. 1997-2007.
46. Haimovici F., Anderson D.J. Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast outgrowth *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 1993, Vol. 49, no. 1, pp. 124-130.
47. Hanley W., McCarty O., Jadhav S., Tseng Y., Wirtz D., Konstantopoulos K. Single molecule characterization of P-selectin/ligand binding. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 12, pp. 10556-10561.
48. Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T.I., Manaster I., Gazit R., Yutkin V., Benharroch D., Porgador A., Keshet E., Yagel S., Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, no. 9, pp. 1065-1074.
49. Hanna J., Wald O., Goldman-Wohl D., Prus D., Markel G., Gazit R., Katz G., Haimov-Kochman R., Fujii N., Yagel S., Peled A., Mandelboim O. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 5, pp. 1569-1577.
50. Hiby S.E., Apps R., Sharkey A.M., Farrell L.E., Gardner L., Mulder A., Claas F.H., Walker J.J., Redman C.W., Morgan L., Tower C., Regan L., Moore G.E., Carrington M., Moffett A. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J. Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, no. 11, pp. 4102-4110.
51. Hinck A.P., Mueller T.D., Springer T.A. Structural Biology and Evolution of the TGF-beta Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2016, Vol. 8, no. 12, a022103. doi: 10.1101/cshperspect.a022103.
52. Hoesel B., Schmid J.A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer*, 2013, Vol. 12, 86. doi: 10.1186/1476-4598-12-86.
53. Hofmann M.H., Mani R., Engelhardt H., Impagnatiello M.A., Carotta S., Kerényi M., Lorenzo-Herrero S., Bottcher J., Scharn D., Arnhof H., Zoephel A., Schnitzer R., Gerstberger T., Sanderson M.P., Rajgolikar G., Goswami S., Vasu S., Etmayer P., Gonzalez S., Pearson M., McConnell D.B., Kraut N., Muthusamy N., Moll J. Selective and Potent CDK8/19 Inhibitors Enhance NK-Cell Activity and Promote Tumor Surveillance. *Mol. Cancer Ther.*, 2020, Vol. 19, no. 4, pp. 1018-1030.
54. Huang Z., Li S., Fan W., Ma Q. Transforming growth factor beta1 promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via TGF-beta/Smad3 signaling pathway. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 20, pp. 33560-33570.
55. Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.*, 2006, Vol. 119, Pt 19, pp. 3901-3903.
56. Hynes R.O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol.*, 2004, Vol. 23, no. 6, pp. 333-340.
57. Ito M., Nishizawa H., Tsutsumi M., Kato A., Sakabe Y., Noda Y., Ohwaki A., Miyazaki J., Kato T., Shiogama K., Sekiya T., Kurahashi H., Fujii T. Potential role for nectin-4 in the pathogenesis of pre-eclampsia: a molecular genetic study. *BMC Med. Genet.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 166. doi: 10.1186/s12881-018-0681-y.
58. Jabrane-Ferrat N. Features of human decidual NK cells in healthy pregnancy and during viral infection. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1397. doi: 10.3389/fimmu.2019.01397.
59. Jiang Y., Yang M., Sun X., Chen X., Ma M., Yin X., Qian S., Zhang Z., Fu Y., Liu J., Han X., Xu J., Shang H. IL-10(+) NK and TGF-beta(+) NK cells play negative regulatory roles in HIV infection. *BMC Infect. Dis.*, 2018, Vol. 18, no. 1, 80. doi: 10.1186/s12879-018-2991-2.

60. Jokhi P.P., King A., Jubinsky P.T., Loke Y.W. Demonstration of the low affinity alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R alpha) on human trophoblast and uterine cells. *J. Reprod. Immunol.*, 1994, Vol. 26, no. 2, pp. 147-164.
61. Jovanovic M., Stefanoska I., Radojic L., Vicovac L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reproduction*, 2010, Vol. 139, no. 4, pp. 789-798.
62. Kennedy P.R., Chazara O., Gardner L., Ivarsson M.A., Farrell L.E., Xiong S., Hiby S.E., Colucci F., Sharkey A.M., Moffett A. Activating KIR2DS4 Is Expressed by Uterine NK Cells and Contributes to Successful Pregnancy. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 197, no. 11, pp. 4292-4300.
63. King A., Allan D.S., Bowen M., Powis S.J., Joseph S., Verma S., Hiby S.E., McMichael A.J., Loke Y.W., Braud V.M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 2000, Vol. 30, no. 6, pp. 1623-1631.
64. Klatt F., Leitner A., Kim I.V., Ho-Xuan H., Schneider E.V., Langhammer F., Weinmann R., Müller M.R., Huber R., Meister G., Kuhn C.-D. A precisely positioned MED12 activation helix stimulates CDK8 kinase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, no. 6, pp. 2894-2905.
65. Koehler M.F., Bergeron P., Blackwood E.M., Bowman K., Clark K.R., Firestein R., Kiefer J.R., Maskos K., McClelland M.L., Orren L., Salphati L., Schmidt S., Schneider E.V., Wu J., Beresini M.H. Development of a potent, specific CDK8 kinase inhibitor which phenocopies CDK8/19 knockout cells. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2016, Vol. 7, no. 3, pp. 223-228.
66. Lash G.E., Otun H.A., Innes B.A., Bulmer J.N., Searle R.F., Robson S.C. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol. Reprod.*, 2005, Vol. 73, no. 2, pp. 374-381.
67. Lash G.E., Otun H.A., Innes B.A., Kirkley M., De Oliveira L., Searle R.F., Robson S.C., Bulmer J.N. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *FASEB J.*, 2006, Vol. 20, no. 14, pp. 2512-2518.
68. Lee C.Q.E., Turco M.Y., Gardner L., Simons B.D., Hemberger M., Moffett A. Integrin alpha2 marks a niche of trophoblast progenitor cells in first trimester human placenta. *Development*, 2018, Vol. 145, 16. doi: 10.1242/dev.162305.
69. Lertkiatmongkol P., Liao D., Mei H., Hu Y., Newman P.J. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr. Opin. Hematol.*, 2016, Vol. 23, no. 3, pp. 253-259.
70. Li W., Li H., Bocking A.D., Challis J.R. Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway. *Biol. Reprod.*, 2010, Vol. 83, no. 3, pp. 481-487.
71. Li Y.-C., Chao T.-C., Jong Kim H., Cholko T., Chen S.-F., Li G., Snyder L., Nakanishi K., Chang C.-E., Murakami K., Garcia B.A., Boyer T.G., Tsai K.-L. Structure and noncanonical Cdk8 activation mechanism within an Argonaute-containing Mediator kinase module The Cdk8 kinase module (CKM) in Mediator, comprising Med13, Med12, CycC, and Cdk8, regulates RNA polymerase II transcription through kinase-dependent and-independent functions. Numerous pathogenic mutations causative for neurodevelopmental disorders and cancer congregates in CKM subunits. *Sci. Adv.*, 2021, Vol. 7, no. 3, eabd4484. doi: 10.1126/sciadv.abd4484.
72. Li Y., Klausen C., Cheng J.C., Zhu H., Leung P.C. Activin A, B, and AB increase human trophoblast cell invasion by up-regulating N-cadherin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014, Vol. 99, no. 11, pp. E2216-E2225.
73. Li Y., Yan J., Chang H.M., Chen Z.J., Leung P.C.K. Roles of TGF-beta Superfamily Proteins in Extravillous Trophoblast Invasion. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2021, Vol. 32, no. 3, pp. 170-189.
74. Li Y.H., Zhou W.H., Tao Y., Wang S.C., Jiang Y.L., Zhang D., Piao H.L., Fu Q., Li D.J., Du M.R. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 13, no. 1, pp. 73-81.
75. Librach C.L., Feigenbaum S.L., Bass K.E., Cui T.Y., Verastas N., Sadovsky Y., Quigley J.P., French D.L., Fisher S.J. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 1994, Vol. 269, no. 25, pp. 17125-17131.
76. Lin L., Chen H., Zhang Y., Lin W., Liu Y., Li T., Zeng Y., Chen J., Du H., Chen R., Tan Y., Liu N. IL-10 Protects Neurites in Oxygen-Glucose-Deprived Cortical Neurons through the PI3K/Akt Pathway. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0136959. doi: 10.1371/journal.pone.0136959.
77. Lu J., Wang Z., Ren L., Sun Y., Cao Y., Xiong Y., Zhang Y. Expression and functional analysis of CXCL12 and its receptors in human term trophoblast cells. *Reprod. Sci.*, 2020, Vol. 27, no. 1, pp. 46-54.
78. Lucas M., Schachterle W., Oberle K., Aichele P., Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, 2007, Vol. 26, no. 4, pp. 503-517.
79. Luger T.A., Krutmann J., Kirnbauer R., Urbanski A., Schwarz T., Klappacher G., Kock A., Micksche M., Malejczyk J., Schauer E. IFN-beta 2/IL-6 augments the activity of human natural killer cells. *J. Immunol.*, 1989, Vol. 143, no. 4, pp. 1206-1209.
80. Lv H., Zhou Q., Li L., Wang S. HLA-C promotes proliferation and cell cycle progression in trophoblast cells. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2021, Vol. 34, no. 4, pp. 512-518.
81. Mace E.M., Zhang J., Siminovitch K.A., Takei F. Elucidation of the integrin LFA-1-mediated signaling pathway of actin polarization in natural killer cells. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 8, pp. 1272-1279.

82. Maenpaa A., Jaaskelainen J., Carpen O., Patarroyo M., Timonen T. Expression of integrins and other adhesion molecules on NK cells; impact of IL-2 on short- and long-term cultures. *Int. J. Cancer*, 1993, Vol. 53, no. 5, pp. 850-855.
83. Maldonado-Estrada J., Menu E., Roques P., Vaslin B., Dautry-Varsat A., Barre-Sinoussi F., Chauat G. Predominant intracellular expression of CXCR4 and CCR5 in purified primary trophoblast cells from first trimester and term human placentae. *Am J. Reprod. Immunol.*, 2003, Vol. 50, no. 4, pp. 291-301.
84. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.*, 2014, Vol. 15, no. 6, 122. doi: 10.1186/gb4184.
85. Marçais A., Cherfils-Vicini J., Viant C., Degouve S., Viel S., Fenis A., Rabilloud J., Mayol K., Tavares A., Bienvenu J., Gangloff Y.G., Gilson E., Vivier E., Walzer T. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 8, pp. 749-757.
86. Marino V.J., Roguin L.P. The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line. *J. Cell. Biochem.*, 2008, Vol. 103, no. 5, pp. 1512-1523.
87. Mason A.T., McVicar D.W., Smith C.A., Young H.A., Ware C.F., Ortaldo J.R. Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *J. Leukoc. Biol.*, 1995, Vol. 58, no. 2, pp. 249-55.
88. Matsumoto G., Nghiem M.P., Nozaki N., Schmits R., Penninger J.M. Cooperation between CD44 and LFA-1/CD11a adhesion receptors in lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 12, pp. 5781-5789.
89. Mei J., Yan Y., Li S.Y., Zhou W.J., Zhang Q., Li M.Q., Sun H.X. CXCL16/CXCR6 interaction promotes endometrial decidualization via the PI3K/AKT pathway. *Reproduction*, 2019, Vol. 157, no. 3, pp. 273-282.
90. Mincheva-Nilsson L., Nagaeva O., Chen T., Stendahl U., Antsiferova J., Mogren I., Hernestal J., Baranov V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 6, pp. 3585-3592.
91. Mingari M.C., Vitale C., Cantoni C., Bellomo R., Ponte M., Schiavetti F., Bertone S., Moretta A., Moretta L. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *Eur. J. Immunol.*, 1997, Vol. 27, no. 6, pp. 1374-1380.
92. Moffett A., Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 5, pp. 1872-1879.
93. Molgora M., Cortez V.S., Colonna M. Killing the invaders: NK cell impact in tumors and anti-tumor therapy. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 4, 595. doi: 10.3390/cancers13040595.
94. Moreau P., Adrian-Cabestre F., Menier C., Guiard V., Gourand L., Dausset J., Carosella E.D., Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int. Immunol.*, 1999, Vol. 11, no. 5, pp. 803-811.
95. Mukhopadhyay A., Kramer J.M., Merckx G., Lugtenberg D., Smeets D.F., Oortveld M.A., Blokland E.A., Agrawal J., Schenck A., van Bokhoven H., Huys E., Schoenmakers E.F., van Kessel A.G., van Nouhuys C.E., Cremers F.P. CDK19 is disrupted in a female patient with bilateral congenital retinal folds, microcephaly and mild mental retardation. *Hum. Genet.*, 2010, Vol. 128, no. 3, pp. 281-291.
96. Naruse K., Innes B.A., Bulmer J.N., Robson S.C., Searle R.F., Lash G.E. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 86, no. 2, pp. 148-150.
97. Natanson-Yaron S., Anteby E.Y., Greenfield C., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Hochner-Celnikier D., Yagel S. FGF 10 and Sprouty 2 modulate trophoblast invasion and branching morphogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, 2007, Vol. 13, no. 7, pp. 511-519.
98. Nishino E., Matsuzaki N., Masuhiro K., Kameda T., Taniguchi T., Takagi T., Saji F., Tanizawa O. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1990, Vol. 71, no. 2, pp. 436-441.
99. Nitta T., Yagita H., Sato K., Okumura K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J. Exp. Med.*, 1989, Vol. 170, no. 5, pp. 1757-1761.
100. O'Connor B.B., Pope B.D., Peters M.M., Ris-Stalpers C., Parker K.K. The role of extracellular matrix in normal and pathological pregnancy: Future applications of microphysiological systems in reproductive medicine. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2020, Vol. 245, no. 13, pp. 1163-1174.
101. Park H.J., Lee S.J., Kim S.H., Han J., Bae J., Kim S.J., Park C.G., Chun T. IL-10 inhibits the starvation induced autophagy in macrophages via class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Mol. Immunol.*, 2011, Vol. 48, no. 4, pp. 720-727.
102. Park S.Y., Kang M.J., Han J.S. Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. *Mol. Brain*, 2018, Vol. 11, no. 1, 39. doi: 10.1186/s13041-018-0383-6.
103. Park S.Y., Yun S., Ryu B.J., Han A.R., Lee S.K. Trophoblasts regulate natural killer cells via control of interleukin-15 receptor signaling. *Am J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 78, no. 2. doi: 10.1111/aji.12628.
104. Pelish H.E., Liau B.B., Nitulescu, II, Tangpeerachaiikul A., Poss Z.C., da Silva D.H., Caruso B.T., Arefolov A., Fadeyi O., Christie A.L., Du K., Banka D., Schneider E.V., Jestel A., Zou G., Si C., Ebmeier C.C., Bronson R.T., Krivtsov A.V., Myers A.G., Kohl N.E., Kung A.L., Armstrong S.A., Lemieux M.E., Taatjes D.J., Shair M.D. Mediator

kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature*, 2015, Vol. 526, no. 7572, pp. 273-276.

105. Peng K.Y., Liu Y.H., Li Y.W., Yen B.L., Yen M.L. Extracellular matrix protein laminin enhances mesenchymal stem cell (MSC) paracrine function through alpha5beta1/CD61 integrin to reduce cardiomyocyte apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.*, 2017, Vol. 21, no. 8, pp. 1572-1583.

106. Peyman J.A., Hammond G.L. Localization of IFN-gamma receptor in first trimester placenta to trophoblasts but lack of stimulation of HLA-DRA, -DRB, or invariant chain mRNA expression by IFN-gamma. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 149, no. 8, pp. 2675-2680.

107. Piao H.L., Wang S.C., Tao Y., Fu Q., Du M.R., Li D.J. CXCL12/CXCR4 signal involved in the regulation of trophoblasts on peripheral NK cells leading to Th2 bias at the maternal-fetal interface. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2015, Vol. 19, no. 12, pp. 2153-2161.

108. Pinola M., Renkonen R., Majuri M.L., Tiisala S., Saksela E. Characterization of the E-selectin ligand on NK cells. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 152, no. 7, pp. 3586-3594.

109. Pitman H., Innes B.A., Robson S.C., Bulmer J.N., Lash G.E. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. *Hum. Reprod.*, 2013, Vol. 28, no. 8, pp. 2075-2086.

110. Poehlmann T.G., Fitzgerald J.S., Meissner A., Wengenmayer T., Schlessner E., Friedrich K., Markert U.R. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta*, 2005, Vol. 26 Suppl A, no. pp. S37-S41.

111. Prakash G.J., Suman P., Morales Prieto D.M., Markert U.R., Gupta S.K. Leukaemia inhibitory factor mediated proliferation of HTR-8/SVneo trophoblast cells is dependent on activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2011, Vol. 23, no. 5, pp. 714-724.

112. Prutsch N., Fock V., Haslinger P., Haider S., Fiala C., Pollheimer J., Knofler M. The role of interleukin-1beta in human trophoblast motility. *Placenta*, 2012, Vol. 33, no. 9, pp. 696-703.

113. Putz E.M., Gotthardt D., Hoermann G., Csiszar A., Wirth S., Berger A., Straka E., Rigler D., Wallner B., Jamieson A.M., Pickl W.F., Zebedin-Brandl E.M., Muller M., Decker T., Sexl V. CDK8-mediated STAT1-S727 phosphorylation restrains NK cell cytotoxicity and tumor surveillance. *Cell Rep.*, 2013, Vol. 4, no. 3, pp. 437-444.

114. Rajagopalan S., Moyle M.W., Joosten I., Long E.O. DNA-PKcs controls an endosomal signaling pathway for a proinflammatory response by natural killer cells. *Sci. Signal.*, 2010, Vol. 3, no. 110, ra14. doi: 10.1126/scisignal.2000467.

115. Riley J.K., Takeda K., Akira S., Schreiber R.D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J. Biol. Chem.*, 1999, Vol. 274, no. 23, pp. 16513-16521.

116. Rosario F.J., Pardo S., Michelsen T.M., Erickson K., Moore L., Powell T.L., Weintraub S.T., Jansson T. Characterization of the primary human trophoblast cell secretome using stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 704781. doi: 10.3389/fcell.2021.704781.

117. Roth I., Corry D.B., Locksley R.M., Abrams J.S., Litton M.J., Fisher S.J. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 184, no. 2, pp. 539-548.

118. Roth I., Fisher S.J. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev. Biol.*, 1999, Vol. 205, no. 1, pp. 194-204.

119. Rouas-Freiss N., Goncalves R.M., Menier C., Dausset J., Carosella E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1997, Vol. 94, no. 21, pp. 11520-11525.

120. Saghian R., Bogle G., James J.L., Clark A.R. Establishment of maternal blood supply to the placenta: insights into plugging, unplugging and trophoblast behaviour from an agent-based model. *Interface Focus*, 2019, Vol. 9, no. 5, 20190019. doi: 10.1098/rsfs.2019.0019.

121. Sahin H., Akpak Y.K., Berber U., Gun I., Demirel D., Ergur A.R. Expression of P-cadherin (cadherin-3) and E-selectin in the villous trophoblast of first trimester human placenta. *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.*, 2014, Vol. 15, no. 1, pp. 13-17.

122. Saito S., Nishikawa K., Morii T., Enomoto M., Narita N., Motoyoshi K., Ichijo M. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int. Immunol.*, 1993, Vol. 5, no. 5, pp. 559-563.

123. Santoni A., Zingoni A., Cerboni C., Gismondi A. Natural killer (NK) cells from killers to regulators: distinct features between peripheral blood and decidual NK cells. *Am J. Reprod. Immunol.*, 2007, Vol. 58, no. 3, pp. 280-288.

124. Sato S., Tomomori-Sato C., Parmely T.J., Florens L., Zybilov B., Swanson S.K., Banks C.A., Jin J., Cai Y., Washburn M.P., Conaway J.W., Conaway R.C. A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol. Cell*, 2004, Vol. 14, no. 5, pp. 685-691.

125. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR Signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017, Vol. 168, no. 6, pp. 960-976.

126. Scarpellini F., Klinger F.G., Rossi G., Sbracia M. Immunohistochemical study on the expression of G-CSF, G-CSFR, VEGF, VEGFR-1, Foxp3 in first trimester trophoblast of recurrent pregnancy loss in pregnancies treated with G-CSF and Controls. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 21, no. 1, 285. doi: 10.3390/ijms21010285.

127. Schanz A., Winn V.D., Fisher S.J., Blumenstein M., Heiss C., Hess A.P., Kruessel J.S., McMaster M., North R.A. Pre-eclampsia is associated with elevated CXCL12 levels in placental syncytiotrophoblasts and maternal blood. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2011, Vol. 157, no. 1, pp. 32-37.
128. Sconocchia G., Titus J.A., Segal D.M. CD44 is a cytotoxic triggering molecule in human peripheral blood NK cells. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5473-5481.
129. Sharma S., Godbole G., Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, no. 3, pp. 341-350.
130. Somersalo K., Carpen O., Saksela E. Stimulated natural killer cells secrete factors with chemotactic activity, including NAP-1/IL-8, which supports VLA-4- and VLA-5-mediated migration of T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1994, Vol. 24, no. 12, pp. 2957-2965.
131. Soroka V., Kolkova K., Kastrup J.S., Diederichs K., Breed J., Kiselyov V.V., Poulsen F.M., Larsen I.K., Welte W., Berezin V., Bock E., Kasper C. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure*, 2003, Vol. 11, no. 10, pp. 1291-1301.
132. Sudheer S., Bhushan R., Fauler B., Lehrach H., Adjaye J. FGF inhibition directs BMP4-mediated differentiation of human embryonic stem cells to syncytiotrophoblast. *Stem Cells. Dev.*, 2012, Vol. 21, no. 16, pp. 2987-3000.
133. Takahashi M., Matsui A., Inao M., Mochida S., Fujiwara K. ERK/MAPK-dependent PI3K/Akt phosphorylation through VEGFR-1 after VEGF stimulation in activated hepatic stellate cells. *Hepatol. Res.*, 2003, Vol. 26, no. 3, pp. 232-236.
134. Takai Y., Miyoshi J., Ikeda W., Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, Vol. 9, no. 8, pp. 603-615.
135. Tarazona R., Lopez-Sejas N., Guerrero B., Hassouneh F., Valhondo I., Pera A., Sanchez-Correa B., Pastor N., Duran E., Alonso C., Solana R. Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, Vol. 69, no. 5, pp. 879-899.
136. Tsutsui T., Fukasawa R., Tanaka A., Hirose Y., Ohkuma Y. Identification of target genes for the CDK subunits of the Mediator complex. *Genes Cells*, 2011, Vol. 16, no. 12, pp. 1208-1218.
137. Turco M.Y., Moffett A. Development of the human placenta. *Development*, 2019, Vol. 146, no. 22, dev163428. doi: 10.1242/dev.163428.
138. Turner N., Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2010, Vol. 10, no. 2, pp. 116-129.
139. Uhrberg M., Valiante N.M., Shum B.P., Shilling H.G., Lienert-Weidenbach K., Corliss B., Tyan D., Lanier L.L., Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, 1997, Vol. 7, no. 6, pp. 753-763.
140. Vacca P., Chiossone L., Mingari M.C., Moretta L. Heterogeneity of NK cells and other innate lymphoid cells in human and murine decidua. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 170. doi: 10.3389/fimmu.2019.00170.
141. Vainchenker W., Dusa A., Constantinescu S.N. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2008, Vol. 19, no. 4, pp. 385-393.
142. Viel S., Marçais A., Guimaraes F.S., Loftus R., Rabilloud J., Grau M., Degouve S., Djebali S., Sanlaville A., Charrier E., Biennu J., Marie J.C., Caux C., Marvel J., Town L., Huntington N.D., Bartholin L., Finlay D., Smyth M.J., Walzer T. TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.*, 2016, Vol. 9, no. 415, ra19. doi: 10.1126/scisignal.aad1884.
143. Villarino A.V., Kanno Y., Ferdinand J.R., O'Shea J.J. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 1, pp. 21-27.
144. Waldmann T.A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, no. 8, pp. 595-601.
145. Wallace A.E., Fraser R., Cartwright J.E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum. Reprod. Update*, 2012, Vol. 18, no. 4, pp. 458-471.
146. Wang R., Jaw J.J., Stutzman N.C., Zou Z., Sun P.D. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 91, no. 2, pp. 299-309.
147. Wang S., Li Y.P., Ding B., Zhao Y.R., Chen Z.J., Xu C.Y., Fu Y.B., Wang X.T. Recurrent miscarriage is associated with a decline of decidual natural killer cells expressing killer cell immunoglobulin-like receptors specific for human leukocyte antigen C. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2014, Vol. 40, no. 5, pp. 1288-1295.
148. Wang S., Zhou X., Yang J. Integrin alphavbeta3 is essential for maintenance of decidua tissue homeostasis and of natural killer cell immune tolerance during pregnancy. *Reprod. Sci.*, 2018, Vol. 25, no. 9, pp. 1424-1430.
149. Wang X.Q., Li D.J. The mechanisms by which trophoblast-derived molecules induce maternal-fetal immune tolerance. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 11, pp. 1204-1207.
150. Wang X.Q., Zhou W.J., Hou X.X., Fu Q., Li D.J. Trophoblast-derived CXCL16 induces M2 macrophage polarization that in turn inactivates NK cells at the maternal-fetal interface. *Cell. Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 15, no. 12, pp. 1038-1046.
151. Weiss I.D., Shoham H., Wald O., Wald H., Beider K., Abraham M., Barashi N., Galun E., Nagler A., Peled A. Ccr5 deficiency regulates the proliferation and trafficking of natural killer cells under physiological conditions. *Cytokine*, 2011, Vol. 54, no. 3, pp. 249-257.
152. Westerling T., Kuuluvainen E., Makela T.P. Cdk8 is essential for preimplantation mouse development. *Mol. Cell. Biol.*, 2007, Vol. 27, no. 17, pp. 6177-6182.

153. Winter C.C., Gumperz J.E., Parham P., Long E.O., Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 2, pp. 571-577.
154. Witalisz-Siepracka A., Gotthardt D., Prchal-Murphy M., Didara Z., Menzl I., Prinz D., Edlinger L., Putz E.M., Sexl V. NK cell-specific CDK8 deletion enhances antitumor responses. *Cancer Immunol. Res.*, 2018, Vol. 6, no. 4, pp. 458-466.
155. Wong M., Uddin S., Majchrzak B., Huynh T., Proudfoot A.E., Platania L.C., Fish E.N. Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, no. 14, pp. 11427-11431.
156. Wu J., Gao F.X., Wang C., Qin M., Han F., Xu T., Hu Z., Long Y., He X.M., Deng X., Ren D.L., Dai T.Y. IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 38, no. 1, 321. doi: 10.1186/s13046-019-1310-0.
157. Wu X., Li D.J., Yuan M.M., Zhu Y., Wang M.Y. The expression of CXCR4/CXCL12 in first-trimester human trophoblast cells. *Biol. Reprod.*, 2004, Vol. 70, no. 6, pp. 1877-1885.
158. Xi M., Chen T., Wu C., Gao X., Wu Y., Luo X., Du K., Yu L., Cai T., Shen R., Sun H. CDK8 as a therapeutic target for cancers and recent developments in discovery of CDK8 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, Vol. 164, pp. 77-91.
159. Xie T.X., Xia Z., Zhang N., Gong W., Huang S. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol. Rep.*, 2010, Vol. 23, no. 3, pp. 725-732.
160. Xing S., Ferrari de Andrade L. NKG2D and MICA/B shedding: a 'tag game' between NK cells and malignant cells. *Clin. Transl. Immunol.*, 2020, Vol. 9, no. 12, e1230. doi: 10.1002/cti2.1230.
161. Xu F., Liu C., Zhou D., Zhang L. TGF-beta/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. *J. Histochem. Cytochem.*, 2016, Vol. 64, no. 3, pp. 157-167.
162. Xu F., Si X., Wang J., Yang A., Qin T., Yang Y. Nectin-3 is a new biomarker that mediates the upregulation of MMP2 and MMP9 in ovarian cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, Vol. 110, pp. 139-144.
163. Yamamoto S., Hagihara T., Horiuchi Y., Okui A., Wani S., Yoshida T., Inoue T., Tanaka A., Ito T., Hirose Y., Ohkuma Y. Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF-kappaB and C/EBPbeta on stimulation of Toll-like receptor 9. *Genes Cells*, 2017, Vol. 22, no. 3, pp. 265-276.
164. Yang Q.E., Giassetti M.I., Ealy A.D. Fibroblast growth factors activate mitogen-activated protein kinase pathways to promote migration in ovine trophoblast cells. *Reproduction*, 2011, Vol. 141, no. 5, pp. 707-714.
165. Zhang C., Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.*, 2017, Vol. 83, pp. 22-30.
166. Zhang M., Wang M., Gao R., Liu X., Chen X., Geng Y., Ding Y., Wang Y., He J. Altered beta1,6-GlcNAc and bisecting GlcNAc-branched N-glycan on integrin beta1 are associated with early spontaneous miscarriage in humans. *Hum. Reprod.*, 2015, Vol. 30, no. 9, pp. 2064-2075.
167. Zhang Q., Lenardo M.J., Baltimore D. 30 Years of NF-kappaB: A blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 2017, Vol. 168, no. 1-2, pp. 37-57.
168. Zhang Y.E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.*, 2009, Vol. 19, no. 1, pp. 128-139.
169. Zhu L., Aly M., Wang H., Karakizlis H., Weimer R., Morath C., Kuon R.J., Toth B., Ekpoom N., Opelz G., Daniel V. Changes of NK cell subsets with time post-transplant in peripheral blood of renal transplant recipients. *Transpl. Immunol.*, 2018, Vol. 49, pp. 59-71.

Авторы:

Гребенкина П.В. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Михайлова В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ошколова А.А. — студент лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Вершинина С.О. — студент ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Grebenskina P.V., Laboratory Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Mikhailova V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, Department of Immunology, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Oshkolova A.A., Student, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Vershinina S.O., Student, National Research ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

Духинова М.С. — к.б.н., ведущий научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
университет ИТМО», Санкт-Петербург, Россия

Баженов Д.О. — младший научный сотрудник
лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»,
Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный
деятель науки РФ, заведующий отделом иммунологии
и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор
кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-
Петербургский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,
Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., доцент, заведующий
лабораторией межклеточных взаимодействий ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»;
профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый
Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,
Россия

Dukhinova M.S., PhD (Biology), Leading Research Associate,
National Research ITMO University, St. Petersburg, Russian
Federation

Bazhenov D.O., Junior Research Associate, Laboratory
of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute
of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg,
Russian Federation

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honoured
Science Worker, Head, Department of Immunology and
Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of
Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Professor,
Department of Immunology, St. Petersburg State I. Pavlov
Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head,
Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research
Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology;
Professor, Department of Immunology, St. Petersburg
State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian
Federation

Поступила 12.07.2022
Принята к печати 29.07.2022

Received 12.07.2022
Accepted 29.07.2022

РОЛЬ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА, ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ И АДИПОКИНОВ В РАЗВИТИИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Смирнова О.В., Гершкорон Ф.А.

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Резюме. Противоречивые данные о роли метаболического синдрома (МС) в развитии гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) актуализируют изучение влияния молекулярных факторов, имеющих значение при МС в развитии ГЦК, что и стало целью нашего обзора.

Были изучены и проанализированы публикации (научные статьи и обзоры) за последние 10 лет по базам данных Web of Science, Scopus, PubMed, РИНЦ. В качестве поисковых фраз использовались «метаболический синдром и неалкогольная жировая болезнь печени», «метаболический синдром и неалкогольный стеатогепатит», «метаболический синдром и гепатоцеллюлярная карцинома». Общее количество изученных публикаций по всем базам данных составило более 570 единиц, при этом в обзоре представлены наиболее значимые результаты на современном этапе.

Инсулинорезистентность и ожирение через развитие системного хронического воспалительного состояния приводят к усилению воспаления и фиброза в печени, которые являются продромальными признаками гепатоканцерогенеза, увеличивают выработку инсулиноподобного фактора роста-1 и нарушают регуляцию пути инсулиноподобного фактора роста. У людей с ГЦК выявлялась гиперэкспрессия ИФР-2. ИФР-связывающие белки из-за сниженной биодоступности свободных ИФР-1 и ИФР-2 в кровотоке способны ингибировать рост ГЦК. При МС обнаруживается провоспалительное состояние, которое обусловлено продукцией адипоцитами цитокинов (IL-6, IL-8, IL-1 β , фактор некроза опухоли α (TNF α), VEGF и хемокиновых лигандов 2 и 5), которые рекрутируют иммунные клетки, способствуя ангиогенезу и усилению хронического воспаления. Факторы транскрипции (PPAR) участвуют в гепатоканцерогенезе, значимость разных факторов до конца не изучена. Лептин имеет положительное прогностическое значение при ГЦК, улучшая общую выживаемость, а висфа-

Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна
Институт фундаментальной биологии
и биотехнологии
660041, Россия, г. Красноярск, Свободный пр., 79.
Тел.: 8 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Address for correspondence:

Olga V. Smirnova
Institute of Fundamental Biology and Biotechnology
660041, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Svobodnyy ave., 79.
Phone: +7 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Смирнова, Ф.А. Гершкорон «Роль инсулиноподобного фактора роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, факторов транскрипции и адипокинов в развитии гепатоцеллюлярной карциномы при метаболическом синдроме» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1109-1118.
doi: 10.15789/1563-0625-ROI-2533

© Смирнова О.В., Гершкорон Ф.А., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Smirnova, F.A. Gershkoron "Role of insulin-like growth factor, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, transcription factors and adipokines in development of hepatocellular carcinoma in metabolic syndrome", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1109-1118.
doi: 10.15789/1563-0625-ROI-2533

© Smirnova O.V., Gershkoron F.A., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ROI-2533

тин оказывает негативное влияние на гепатоканцерогенез. Активация PAI-1 ингибирует прогрессирование ГЦК через стимуляцию PPAR γ .

Адипонектин может быть маркером прогноза при ГЦК, минимальная его концентрация в сыворотке, положительно коррелирует с более неблагоприятным прогнозом.

Ключевые слова: метаболический синдром, неалкогольная жировая болезнь печени, гепатоцеллюлярная карцинома, цитокины, адипокины, факторы транскрипции

ROLE OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR, PRO-INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES, TRANSCRIPTION FACTORS AND ADIPOKINES IN DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN METABOLIC SYNDROME

Smirnova O.V., Gershkoron F.A.

Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Conflicting data on the role of the metabolic syndrome (MS) in the development of hepatocellular carcinoma (HCC) require studies on the influence of molecular factors that are important in the development of HCC in MS, which was the goal of our review.

Publications (scientific articles and reviews) over the past 10 years were studied and analyzed using the databases Web of Science, Scopus, PubMed, RSCI. The terms used for the search were “metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease”, “metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis”, “metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma”. The total number of publications studied in all databases exceeded 570 units, while the review presents the most significant results at the present stage.

Insulin resistance and obesity, through the development of a systemic chronic inflammatory state, lead to increased inflammation and fibrosis in the liver, which are prodromal signs of hepatocarcinogenesis, increase the production of insulin-like growth factor-1 and disrupt the regulation of the insulin-like growth factor pathway. People with HCC have been shown to overexpress IGF-2. IGF-binding proteins, due to the reduced bioavailability of free IGF-1 and IGF-2 in the circulation, are able to inhibit the growth of HCC. In MS, a pro-inflammatory state is detected, which is caused by the production of cytokines by adipocytes (IL-6, IL-8, IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF α), VEGF and chemokine ligands 2 and 5), which recruit immune cells, promoting angiogenesis and enhancing chronic inflammation. Transcription factors (PPAR) are involved in hepatocarcinogenesis, the significance of different factors is not fully understood. Leptin has a positive prognostic value in HCC, improving overall survival, and visfatin has a negative effect on hepatocarcinogenesis. Activation of PAI-1 inhibits the progression of HCC through PPAR γ stimulation.

Adiponectin may be a prognostic marker in HCC, with a lower serum concentration positively correlated with worse prognosis.

Keywords: metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease, hepatocellular carcinoma, cytokines, adipokines, transcription factors

В настоящее время существуют противоречивые данные о роли метаболического синдрома (МС) в развитии гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Большинство исследований указывают, что фенотипическим проявлением МС является неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) или неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), при этом частота поражения печени и ее выраженность положительно зависят от ИМТ и количества компонентов МС. Chiang и соавт. [11] в новейшем проспективном когортном исследовании, основанном на общенациональных центрах скрининга здоровья, обнаружили, что сахарный диабет 2-го типа (СД2) (скорректи-

патит (НАСГ), при этом частота поражения печени и ее выраженность положительно зависят от ИМТ и количества компонентов МС. Chiang и соавт. [11] в новейшем проспективном когортном исследовании, основанном на общенациональных центрах скрининга здоровья, обнаружили, что сахарный диабет 2-го типа (СД2) (скорректи-

рованный показатель ОШ = 3,38) положительно связан со смертностью от ГЦК. Удивительно, но гипертриглицеридемия (ОШ = 0,38) и гиперхолестеринемия (ОШ = 0,50) были обратно связаны со смертностью от ГЦК. МС, как определено критериями Американской кардиологической ассоциации / Национального института сердца и легких (ОШ = 0,63) или критериями Международной диабетической федерации (ОШ = 0,62), обратно ассоциировался со смертностью от ГЦК, особенно у мужчин [11]. Этот вывод не был подтвержден другим современным системным обзором и метаанализом, анализирующим четыре исследования с общим числом участников более 800 тысяч человек. Возраст участников от 30 до 84 лет. Комбинированный анализ показал общее повышение риска ГЦК на 81% в случаях МС (относительный риск 1,81) [30]. Противоречивые данные о роли МС в развитии ГЦК актуализируют изучение влияния молекулярных факторов, имеющих значение при МС в развитии ГЦК, что и стало целью нашего обзора.

Влияние ИФР на печень при метаболическом синдроме

Гипергликемия оказывает вредное метаболическое воздействие на печень, нарушая метаболизм глюкозы, липидов, желчных кислот и триглицеридов и приводя к нарушению некоторых клеточных процессов [9, 14, 16]. Следует подчеркнуть, что инсулинорезистентность (ИР) приводит к системному воспалению с гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, таких как TNF α и IL-6, и некоторых адипокинов, таких как лептин, тогда как другие молекулы с противовоспалительными свойствами снижаются, такие как адипонектин [24]. Эти результаты не удивительны, поскольку ИР почти всегда связана с ожирением, и оба являются основными компонентами МС. В этом смысле, очевидно, что ИР и ожирение через развитие системного хронического воспалительного состояния приводят к усилению воспаления и фиброза в печени, которые являются продромальными признаками гепатоканцерогенеза [17]. Снижение уровня адипонектина почти всегда обнаруживается у пациентов с ИР и у пациентов с повышенным ИМТ на фоне неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и связано с развитием фиброза печени [19].

Более того, ИР и гиперинсулинемия могут увеличивать выработку инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) и, как правило, нарушать регуляцию пути инсулиноподобного фактора роста (ИФР) [28].

Аберрантная активация сигнальных путей фактора роста является важным механизмом раз-

вития и прогрессирования гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Наиболее изученными сигнальными путями фактора роста являются трансформирующий фактор роста α (TGF- α)/EGF-R, трансформирующий фактор роста β (TGF- β)/T β R, фактор роста гепатоцитов/MET и бескрылый (Wnt/frizzled/ β -катенин) – сигнальные пути [66]. В сочетании с этим нарушение регуляции пути ИФР, участвующего в тонкой регуляции пролиферации и антиапоптозе клеток неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), имеет решающее значение [5, 72].

Сигнальный путь инсулиноподобного фактора роста (ИФР) состоит из нескольких компонентов. Лигандами ИФР являются ИФР-1 и ИФР-2, два пептида, которые имеют большое сходство с инсулином. Семейство белков-носителей, называемых белками, связывающими инсулиноподобный фактор роста, связывает ИФР-1 и ИФР-2 в крови. ИФР-1 и ИФР-2 действуют как аутокринные, паракринные и эндокринные факторы роста и в основном вырабатываются в печени, особенно ИФР-1 в постнатальный период и ИФР-2 во время внутриутробного развития. Они могут воздействовать на различные рецепторы, но имеют более высокое сродство с ИФР-1R, рецептором тирозинкиназы, структурно сходным с рецептором инсулина (Ir). ИФР-1 также может связывать Ir, но с более низкой аффинностью, чем ИФР-1R, в то время как ИФР-2 связывает Ir только во время внутриутробного развития. ИФР-2R структурно подобен ИФР-1R, но связывает только ИФР-2 и, скорее всего, действует на этот гормон роста с ингибирующим эффектом, как сайт клиренса. Другой рецептор является гибридным, состоящим из гемирецепторов инсулина и ИФР-1R, который предпочтительно связывает ИФР-1, в то время как инсулин не имеет такого оптимального связывания [72].

Многие исследования показали, что мРНК ИФР-1 была недостаточно экспрессирована в тканях ГЦК [13], в то время как в моделях на животных и у людей с ГЦК экспрессия ИФР-2 соответствовала гиперэкспрессии [72]. Эти молекулы в основном вырабатываются в печени, и было высказано предположение, что снижение выработки ИФР-1 может быть связано со сниженной функцией печени из-за одновременного наличия хронического заболевания печени или цирроза или со сниженной экспрессией рецепторов гормона роста в печени при наличии опухолевой ткани [57, 61].

Физиологически экспрессия ИФР-2 ограничена во время внутриутробного развития. Вырабатывается моноаллельный, импринтирован-

ный по материнской линии ИФР-2, который во взрослом возрасте заменяется биаллельной формой [61]. Во время гепатоканцерогенеза реактивация фетального промотора приводит к сверхэкспрессии фетального ИФР-2 [63]. ИФР-2 оказывает стимулирующее действие на клеточную пролиферацию [58] и ангиогенез [3], кроме того, он оказывает антиапоптотическое действие и его концентрации положительно связаны с экспрессией сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в исследованиях *in vitro* [74]. Роль ИФР-2 не ограничивается только ГЦК, но он также может действовать в раннем гепато-канцерогенезе, поскольку преднеопластические поражения печени экспрессируют мРНК ИФР-2 [6, 40]. Для анализа физиологических и патологических функций ИФР-1 и ИФР-2 необходимо учитывать их взаимодействие со специфическими рецепторами (ИФР-1R и ИФР-2R). ИФР-1R избыточно экспрессируется *in vitro* и на животных моделях ГЦК [66, 67], и было продемонстрировано, что лиганды ИФР оказывают свое влияние на клетки ГЦК через ИФР-1R и что он участвует в дегенерации преднеопластических поражений за счет увеличения их митотической активности [75]. ИФР-2R является местом клиренса для ИФР-2, поэтому он может оказывать ингибирующее действие на путь ИФР [51]. ИФР-2R был недостаточно экспрессирован в исследованиях *in vitro*, на животных моделях и при ГЦК человека [73]. Уровни ИФР-2R и TGF- β , другого ингибитора роста, снижены при ГЦК человека по сравнению с соседними нормальными тканями печени [65]. На основании всех этих результатов можно предположить, что субстраты ИФР (IRS-1 и IRS-2), оба способны способствовать образованию и прогрессированию ГЦК. И наоборот, ИФР-связывающие белки (ИФРСБ) из-за сниженной биодоступности свободных ИФР-1 и ИФР-2 в кровотоке, по-видимому, способны ингибировать рост ГЦК. Действительно, уровни ИФРСБ-3 и ИФРСБ-7 снижены в тканях ГЦК, а добавление этих молекул в модели ГЦК уменьшает рост и объем новообразований печени [73].

На основании данных, объединяющих ИР и сахарный диабет 2 типа (СД2) с ГЦК, за последнее десятилетие во многих исследованиях были предприняты попытки проанализировать возможную роль антидиабетических препаратов в терапии ГЦК. Недавно Singh и соавт. [60] провели метаанализ и пришли к выводу, что некоторые препараты, такие как метформин, могут снижать риск развития ГЦК, в то время как другие, такие как инсулин, могут повышать риск ГЦК. В том же отчете тиазолидиндионы (ТЗД), по-видимому,

не изменяют риск, но несколько исследований *in vitro* [76] и на животных [4] показали, что эти молекулы могут действовать как регуляторы клеточного цикла, подавляя рост ГЦК.

Роль провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при ГЦК

Жировая ткань — это не просто орган хранения, в котором липиды сохраняются как источник энергии. Это активный орган с важными эндокринными, паракринными и аутокринными функциями, а также с иммунными функциями. Адипоциты продуцируют широкий спектр гормонов, цитокинов и факторов роста, которые могут действовать локально в микроокружении жировой ткани и системно [52]. Патологическая гипертрофия и гиперплазия адипоцитов, которые можно обнаружить у лиц с ожирением, приводят к нарушению регуляции многих эндокринных функций с важными последствиями [20]. При ожирении нарушается созревание адипоцитов. Это приводит к относительному увеличению популяций преадипоцитов и, следовательно, к модификации местного микроокружения. Преадипоциты продуцируют цитокины с провоспалительными и ангиогенетическими свойствами, идеально подходящими для их собственной пролиферации. Цитокины, сверхпродуцируемые в адипоцитах при ожирении, включают интерлейкин (IL)-6, IL-8, IL-1 β , фактор некроза опухоли α (TNF α), VEGF и хемокиновые лиганды 2 и 5 (CCL2 и CCL5), которые могут способствовать рекрутированию иммунных клеток и ангиогенезу [21]. Более того, продукция провоспалительных и хемоаттрактантных молекул жировой тканью приводит к рекрутированию и активации макрофагов, которые способны усиливать хронический вялотекущий воспалительный ответ [70]. Провоспалительное состояние также способно к самообновлению, поскольку многие гиперэкспрессированные цитокины, такие как TNF α , IL-1 β , TGF- β и интерферон- γ , способны блокировать созревание преадипоцитов в адипоциты. Вялотекущий хронический воспалительный процесс был связан с ИР у мышей с ожирением [26], и, в частности, TNF α , по-видимому, играет фундаментальную роль, ингибируя фосфорилирование тирозина рецептора инсулина [25] и усиливая продукцию другого важного провоспалительного цитокина, IL-6 [50]. Shimizu и соавт. [59] недавно проанализировали основные данные, связывающие ожирение, воспаление и развитие ГЦК.

В этом процессе участвуют два важных адипонектина. Адипонектин обладает антиангиогенетическими и антипролиферативными свойствами, но также недостаточно экспрессируется

у тучных людей в пользу повышенной экспрессии лептина [32, 44]. Уровни адипонектина обратно пропорциональны ИМТ [31], таким образом, гипoadипонектинемия связана с развитием большинства последствий ожирения, таких как цереброваскулярные заболевания и дислипидемия [10]. Модели на животных показали, что гипoadипонектинемия может играть роль в гепатоканцерогенезе, особенно при наличии воспаления и некроза (НАСГ) [2, 18]. Исследования на людях показали, что адипонектин может быть полезен в качестве прогностического фактора при ГЦК, поскольку его концентрация в сыворотке, по-видимому, положительно коррелирует с более неблагоприятным прогнозом [54, 68], даже если при раннем ГЦК он имеет меньшее значение [45].

Участие факторов транскрипции в патогенезе ГЦК

ТЗД действуют на рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом (PPAR). PPAR α , γ и δ являются членами надсемейства ядерных рецепторов, активируемых лигандом факторов транскрипции, которые играют центральную роль в хранении и катаболизме жирных кислот. Каждый из трех подтипов PPAR экспрессируется по отличному тканеспецифичному паттерну. PPAR α высоко экспрессируется в печени, сердце, почках, скелетных мышцах и бурых жировых тканях, которые метаболически очень активны. PPAR γ наиболее сильно экспрессируется в белой и бурой жировой ткани, толстой кишке и селезенке. В отличие от PPAR α и PPAR γ , которые обильно экспрессируются лишь в нескольких тканях, PPAR δ практически экспрессируется во всех тканях на сопоставимых уровнях. Еще одной важной функцией PPAR является регуляция клеточного цикла, и благодаря этому свойству они участвуют в канцерогенезе [37].

PPAR α , по-видимому, ингибирует канцерогенез, обладая антиангиогенной активностью за счет продукции тромбоспондина и противовоспалительных свойств (подавляет IL-1 β , экспрессию TNF и ICAM1) [22, 49, 62]. С другой стороны, стимуляция PPAR α агонистами вызывает гепатомегалию и ГЦК после длительной терапии на животных моделях [53]. Физиологическая стимуляция PPAR α может подавлять рак за счет модуляции микроокружения и микроциркуляции, однако его непрерывная аномальная стимуляция может способствовать гепатоканцерогенезу [34]. PPAR γ гиперэкспрессируется в печени с жировой дистрофией и конститутивно экспрессируется в жировой ткани и макрофагах [71]. Имеются противоречивые данные о его роли в гепатоканце-

рогенезе, поскольку в различных исследованиях он избыточно, нормально или недостаточно экспрессируется [38, 56, 76]. В исследованиях *in vitro* PPAR γ ингибирует различные карциномы, включая ГЦК, скорее всего, путем регуляции апоптоза через пути p21, p53 и p27 [35]. Недавнее исследование, проведенное Pang и соавт. [48], подтвердило ингибирующее действие PPAR γ на гепатоканцерогенез посредством усиления фактора 1 активатора плазминогена (PAI 1).

Комплексная роль лептина, висфатина и PAI-1 при ГЦК

Лептин – это белок, кодируемый геном *ob* [55], участвующим в регуляции массы тела и энергетического баланса, и он продуцируется в основном адипоцитами [29]. Пациенты с ожирением имеют повышенный уровень циркулирующего лептина, а также устойчивы к его активности [33]. В печени лептин предотвращает накопление липидов и липотоксичность [12]. С другой стороны, модели на животных показали, что он обладает профиброгенными свойствами, увеличивая экспрессию проколлагена I, TGF- β 1, гладкомышечного актина и увеличивая выработку тканевого ингибитора металлопротеазы 1 в активированных звездчатых клетках печени [7, 8], основных участников в фиброзе печени. Более того, лептин способствует пролиферации звездчатых клеток печени, ингибируя их апоптоз [55], а активированные эти клетки сами способны продуцировать лептин [27]. Продукция адипокина и, следовательно, его действие нарушены не только у пациентов с ожирением, но и у пациентов с НАЖБП с НАСГ или без него, даже если взаимосвязь между его уровнями в сыворотке на сегодняшний день не коррелирует с тяжестью фиброза печени, как ожидалось из-за его фиброгенных свойств [13].

Возможная стимуляция PPAR α , по-видимому, ингибирует канцерогенез, обладая антиангиогенной активностью за счет продукции тромбоспондина и противовоспалительных свойств (подавляет интерлейкин-1 β , экспрессию TNF и ICAM1) [23, 46, 47].

С другой стороны, активация PPAR α агонистами вызывает гепатомегалию и ГЦК после длительной терапии на животных моделях [53]. Физиологическая стимуляция PPAR α может подавлять рак за счет модуляции микроокружения и микроциркуляции, однако его непрерывная аномальная стимуляция может способствовать гепатоканцерогенезу [36]. PPAR γ гиперэкспрессируется в печени с жировой дистрофией и конститутивно экспрессируется в жировой ткани и макрофагах [71]. Имеются противоречивые данные о его роли в гепатоканцерогенезе, поскольку

в различных исследованиях он избыточно, нормально или недостаточно экспрессируется [39, 57, 74]. В исследованиях *in vitro* PPAR γ ингибирует различные карциномы, включая ГЦК, скорее всего, путем регуляции апоптоза через пути p21, p53 и p27, однако недавние исследования также показали, что повышенные уровни лептина связаны с индукцией VEGF в стволовых клетках печени [1] и с венозной инвазией при раке почки [41, 43], что предполагает возможную аналогичную роль при ГЦК. Однако по этому вопросу имеется много противоречивых данных. Иммуномодулирующий эффект лептина может привести к пролиферации и активации естественных клеток-киллеров и, следовательно, к уменьшению размера опухоли [15]. Два последующих исследования Wang и соавт. [68, 69] подтверждают утверждение о том, что лептин может иметь положительное прогностическое значение при ГЦК, улучшая общую выживаемость.

Хотя лептин и адипонектин являются наиболее изученными адипокинами, жировая ткань продуцирует широкий спектр молекул, относящихся к этой группе. Некоторые цитокины (TNF α , TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), хемокины и белки острой фазы (гаптоглобин, сывороточный амилоид-А и PAI-1) систематизируются в этой группе [64]. Они участвуют в инициации и прогрессировании системного хронического воспалительного статуса, обнаруживаемого у пациентов с ожирением, что, в свою очередь, связано с патогенезом ГЦК. Имеются данные, что PAI-1 может ингибировать инвазию и пролиферацию ГЦК *in vitro* [46]. Эти данные противоречат концепции, что PAI-1 избыточно экспрессируется у пациентов с ожирением и что более высокие концентрации этого адипокина ухудшают ИР и нарушают метаболизм липидов [42]. Недавно первая теория была подтверждена в отчете о корреляции ингибирования прогрессирования ГЦК со стимуляцией PPAR γ через активацию PAI-1 [49]. Наоборот, висфатин, другой адипокин, по-видимому, оказывает негативное влияние на гепатоканцерогенез, указывая на то, что адипокины играют различную роль в прогрессировании ГЦК [47].

Заключение

Противоречивые данные о роли МС в развитии ГЦК актуализируют изучение влияния инсулиноподобного фактора роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, факторов транскрипции и адипокинов, имеющих огромное значение при МС в патогенезе ГЦК. Компонентом МС является ИР и гиперинсулинемия, которые увеличивают выработку ИФР-1 и нарушают его регуляцию. При ГЦК выявляется дисбаланс в виде снижения экспрессии ИФР-1 и гиперэкспрессии ИФР-2. Субстраты ИФР способствуют образованию и прогрессированию ГЦК, а ИФР-связывающие белки способны ингибировать рост ГЦК. Снижает риск развития ГЦК метформин, а инсулин наоборот повышает риск ГЦК. Адипоциты жировой ткани при МС продуцируют провоспалительные цитокины, которые активируют макрофаги, создавая хронический вялотекущий воспалительный ответ в печеночной ткани. Провоспалительное состояние блокирует созревание преадипоцитов в адипоциты, усугубляя ИР и ожирение. При МС также выявляется нарушение в балансе адипонектина и лептина в пользу последнего. Уровни адипонектина обратно пропорциональны ИМТ, а гипoadипонектинемия связана с развитием ожирения и его осложнений. Адипонектин может быть маркером прогноза при ГЦК, минимальная его концентрация в сыворотке, положительно коррелирует с более неблагоприятным прогнозом. Противоречива роль факторов транскрипции в развитии ГЦК при МС, что требует дальнейшего их изучения. Жировая ткань продуцируя некоторые цитокины (TNF α , TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), хемокины и белки острой фазы (гаптоглобин, сывороточный амилоид-А и PAI-1) способствует развитию метаболических нарушений, участвует в инициации и прогрессировании системного хронического воспалительного статуса, обнаруживаемого у пациентов с ожирением и МС, что, в свою очередь, обуславливает патогенез ГЦК.

Список литературы / References

1. Aleffi S., Petrai I., Bertolani C., Parola M., Colombatto S., Novo E., Vizzutti F., Anania F.A., Milani S., Rombouts K., Laffi G., Pinzani M., Marra F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2005, Vol. 42, pp. 1339-1348.
2. Asano T., Watanabe K., Kubota N., Gunji T., Omata M., Kadowaki T., Ohnishi S. Adiponectin knockout mice on high fat diet develop fibrosing steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, Vol. 24, pp. 1669-1676.

3. Bae M.H., Lee M.J., Bae S.K., Lee O.H., Lee Y.M., Park B.C., Kim K.W. Insulin-like growth factor II (IGF-II) secreted from HepG2 human hepatocellular carcinoma cells shows angiogenic activity. *Cancer Lett.*, 1998, Vol. 128, pp. 41-46.
4. Borbath I., Leclercq I., Moulin P., Sempoux C., Horsmans Y. The PPARgamma agonist pioglitazone inhibits early neoplastic occurrence in the rat liver. *Eur. J. Cancer*, 2007, Vol. 43, pp. 1755-1763.
5. Breuhahn K., Schirmacher P. Reactivation of the insulin-like growth factor-II signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2008, Vol. 14, pp. 1690-1698.
6. Breuhahn K., Vreden S., Haddad R., Beckebaum S., Stippel D., Flemming P., Nussbaum T., Caselmann W.H., Haab B.B., Schirmacher P. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, pp. 6058-6064.
7. Cao Q., Mak K.M., Lieber C.S. Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H₂O₂-dependent MAPK pathways. *J. Cell. Biochem.*, 2006, Vol. 97, pp. 188-197.
8. Cao Q., Mak K.M., Ren C., Lieber C.S. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependant MAPK pathways. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, pp. 4292-4304.
9. Chandrasekaran K., Swaminathan K., Chatterjee S., Dey A. Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. *Toxicol. In Vitro*, 2010, Vol. 24, pp. 387-396.
10. Chen M.P., Tsai J.C., Chung F.M., Yang S.S., Hsing L.L., Shin S.J., Lee Y.J. Hypoadiponectinemia is associated with ischemic cerebrovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, pp. 821-826.
11. Chiang C.H., Lee L.T., Hung S.H., Lin W.Y., Hung H.F., Yang W.S., Sung P.K., Huang K.C. Opposite association between diabetes, dyslipidemia, and hepatocellular carcinoma mortality in the middle-aged and elderly. *Hepatology*, 2014, Vol. 59, pp. 2207-2215.
12. Chitturi S., Farrell G., Frost L., Kriketos A., Lin R., Fung C., Liddle C., Samarasinghe D., George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*, 2002, Vol. 36, pp. 403-409.
13. Cruz M.L., Goran M.I. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Curr. Diab. Rep.*, 2004, Vol. 4, pp. 53-62.
14. Duran-Sandoval D., Mautino G., Martin G., Percevault F., Barbier O., Fruchart J.C., Kuipers F., Staels B. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*, 2004, Vol. 53, pp. 890-898.
15. Elinav E., Abd-Elnabi A., Pappo O., Bernstein I., Klein A., Engelhardt D., Rabbani E., Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice via leptin, is associated with inhibition of tumor cell growth and natural killer cell activation. *J. Hepatol.*, 2006, Vol. 44, pp. 529-536.
16. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.*, 2002, Vol. 23, pp. 599-622.
17. Fierbinteanu-Braticevici C., Negreanu L., Tarantino G. Is fatty liver always benign and should not consequently be treated? *J. Physiol. Pharmacol.*, 2013, Vol. 64, pp. 3-9.
18. Fukushima J., Kamada Y., Matsumoto H., Yoshida Y., Ezaki H., Takemura T., Saji Y., Igura T., Tsutsui S., Kihara S., Funahashi T., Shimomura I., Tamura S., Kiso S., Hayashi N. Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatol. Res.*, 2009, Vol. 39, pp. 724-738.
19. Gannagé-Yared M.H., Khalife S., Semaan M., Fares F., Jambart S., Halaby G. Serum adiponectin and leptin levels in relation to the metabolic syndrome, androgenic profile and somatotrophic axis in healthy non-diabetic elderly men. *Eur. J. Endocrinol.*, 2006, Vol. 155, pp. 167-176.
20. Gesta S., Tseng Y.H., Kahn C.R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 2007, Vol. 131, pp. 242-256.
21. Gilbert C.A., Slingerland J.M. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. *Annu. Rev. Med.*, 2013, Vol. 64, pp. 45-57.
22. Grau R., Punzón C., Fresno M., Iñiguez M.A. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclooxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. *Biochem. J.*, 2006, Vol. 395, pp. 81-88.
23. Giorgio V., Prono F., Graziano F., Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatr.*, 2013, Vol. 13, 40. doi: 10.1186/1471-2431-13-40.
24. Hashimoto E., Tokushige K. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic? *Hepatol. Res.*, 2012, Vol. 42, pp. 1-14.
25. Hotamisligil G.S., Budavari A., Murray D., Spiegelman B.M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Invest.*, 1994, Vol. 94, pp. 1543-1549.

26. Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993, Vol. 259, pp. 87-91.
27. Ikejima K., Takei Y., Honda H., Hirose M., Yoshikawa M., Zhang Y.J., Lang T., Fukuda T., Yamashina S., Kitamura T., Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology*, 2002, Vol. 122, pp. 1399-1410.
28. Ish-Shalom D., Christoffersen C.T., Vorwerk P., Sacerdoti-Sierra N., Shymko R.M., Naor D., de Meyts P. Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor. *Diabetologia*, 1997, Vol. 40, Suppl. 2, pp. S25-S31.
29. Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002, Vol. 967, pp. 379-388.
30. Jinjuvadia R., Patel S., Liangpunsakul S. The association between metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: systemic review and meta-analysis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 48, pp. 172-177.
31. Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, pp. 1784-1792.
32. Kamada Y., Takehara T., Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J. Gastroenterol.*, 2008, Vol. 43, pp. 811-822.
33. Kiess W., Penke M., Sergeev E., Neef M., Adler M., Gausche R., Körner A. Childhood obesity at the crossroads. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 2015, Vol. 28, pp. 481-484.
34. Kimura O., Kondo Y., Shimosegawa T. PPAR Could contribute to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *PPAR Res.*, 2012, Vol. 2012, 574180. doi: 10.1155/2012/574180.
35. Khalyfa A., Kheirandish-Gozal L., Bhattacharjee R., Khalyfa A.A., Gozal D. Circulating microRNAs as potential biomarkers of endothelial dysfunction in obese children. *Chest*, 2016, Vol. 149, pp. 786-800.
36. Kliewer S.A., Xu H.E., Lambert M.H., Willson T.M. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog. Horm. Res.*, 2001, Vol. 56, pp. 239-263.
37. Kłusek-Oksiuta M., Białokoz-Kalinowska I., Tarasów E., Wojtkowska M., Werpachowska I., Lebensztejn D.M. Chemerin as a novel non-invasive serum marker of intrahepatic lipid content in obese children. *Ital. J. Pediatr.*, 2014, Vol. 40, 84. doi: 10.1186/s13052-014-0084-4.
38. Koga H., Sakisaka S., Harada M., Takagi T., Hanada S., Taniguchi E., Kawaguchi T., Sasatomi K., Kimura R., Hashimoto O., Ueno T., Yano H., Kojiro M., Sata M. Involvement of p21(WAF1/Cip1), p27(Kip1), and p18(INK4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology*, 2001, Vol. 33, pp. 1087-1097.
39. Kotnik P., Fischer P.P., Wabitsch M. Endocrine and metabolic effects of adipose tissue in children and adolescents. *Zdr. Varst.*, 2015, Vol. 54, pp. 131-138.
40. Lahm H., Gittner K., Krebs O., Sprague L., Deml E., Oesterle D., Hoeflich A., Wanke R., Wolf E. Diethylnitrosamine induces long-lasting re-expression of insulin-like growth factor II during early stages of liver carcinogenesis in mice. *Growth Horm. IGF Res.*, 2002, Vol. 12, pp. 69-79.
41. Li L., Gao Y., Zhang L.L., He D.L. Concomitant activation of the JAK/STAT3 and ERK1/2 signaling is involved in leptin-mediated proliferation of renal cell carcinoma Caki-2 cells. *Cancer Biol. Ther.*, 2008, Vol. 7, pp. 1787-1792.
42. Liang X., Kanjanabuch T., Mao S.L., Hao C.M., Tang Y.W., Declerck P.J., Hasty A.H., Wasserman D.H., Fogo A.B., Ma L.J. Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006, Vol. 290, pp. E103-E113.
43. Liao L.M., Schwartz K., Pollak M., Graubard B.I., Li Z., Ruterbusch J., Rothman N., Davis F., Wacholder S., Colt J., Chow W.H., Purdue M.P. Serum leptin and adiponectin levels and risk of renal cell carcinoma. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, Vol. 21, pp. 1478-1485.
44. Marra F., Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, 2009, Vol. 50, pp. 957-969.
45. Miuma S., Ichikawa T., Taura N., Shibata H., Takeshita S., Akiyama M., Motoyoshi Y., Ozawa E., Fujimoto M., Kawashimo H., Miyaaki H., Eguchi K., Nakao K. The level of fasting serum insulin, but not adiponectin, is associated with the prognosis of early stage hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2009, Vol. 22, pp. 1415-1424.
46. Morita Y., Hayashi Y., Kanamaru T., Itoh T., Suzuki S., Yamamoto M., Kuroda Y., Itoh H. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in invasion and proliferation of HLE hepatocellular carcinoma cells. *Jpn J. Cancer Res.*, 1999, Vol. 90, pp. 747-752.
47. Ninomiya S., Shimizu M., Imai K., Takai K., Shiraki M., Hara T., Tsurumi H., Ishizaki S., Moriwaki H. Possible role of visfatin in hepatoma progression and the effects of branched-chain amino acids on visfatin-induced proliferation in human hepatoma cells. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 2011, Vol. 4, pp. 2092-2100.
48. Pang X., Wei Y., Zhang Y., Zhang M., Lu Y., Shen P. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by upregulating plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Sci.*, 2013, Vol. 104, pp. 672-680.

49. Panigrahy D., Kaipainen A., Huang S., Butterfield C.E., Barnés C.M., Fannon M., Laforme A.M., Chaponis D.M., Folkman J., Kieran M.W. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105, pp. 985-990.
50. Park E.J., Lee J.H., Yu G.Y., He G., Ali S.R., Holzer R.G., Osterreicher C.H., Takahashi H., Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 2010, Vol. 140, pp. 197-208.
51. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer*, 2008, Vol. 8, pp. 915-928.
52. Rajala M.W., Scherer P.E. Minireview: The adipocyte – at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 2003, Vol. 144, pp. 3765-3773.
53. Reddy J.K., Rao S., Moody D.E. Hepatocellular carcinomas in acatalasemic mice treated with nafenopin, a hypolipidemic peroxisome proliferator. *Cancer Res.*, 1976, Vol. 36, pp. 1211-1217.
54. Sadik N.A., Ahmed A., Ahmed S. The significance of serum levels of adiponectin, leptin, and hyaluronic acid in hepatocellular carcinoma of cirrhotic and noncirrhotic patients. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2012, Vol. 31, pp. 311-321.
55. Saxena N.K., Titus M.A., Ding X., Floyd J., Srinivasan S., Sitaraman S.V., Anania F.A. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J.*, 2004, Vol. 18, pp. 1612-1614.
56. Schaefer K.L., Wada K., Takahashi H., Matsushashi N., Ohnishi S., Wolfe M.M., Turner J.R., Nakajima A., Borkan S.C., Saubermann L.J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, pp. 2251-2259.
57. Scharf J.G., Dombrowski F., Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol. Pathol.*, 2001, Vol. 54, pp. 138-144.
58. Scharf J.G., Schmidt-Sandte W., Pahernik S.A., Ramadori G., Bräulke T., Hartmann H. Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC). *Carcinogenesis* 1998, Vol. 19, pp. 2121-2128.
59. Shimizu M., Tanaka T., Moriwaki H. Obesity and hepatocellular carcinoma: targeting obesity-related inflammation for chemoprevention of liver carcinogenesis. *Semin. Immunopathol.*, 2013, Vol. 35, pp. 191-202.
60. Singh S., Singh P.P., Singh A.G., Murad M.H., Sanchez W. Antidiabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.*, 2013, Vol. 108, pp. 881-891.
61. Su T.S., Liu W.Y., Han S.H., Jansen M., Yang-Fen T.L., P'eng F.K., Chou C.K. Transcripts of the insulin-like growth factors I and II in human hepatoma. *Cancer Res.*, 1989, Vol. 49, pp. 1773-1777.
62. Torra I.P., Gervois P., Staels B. Peroxisome proliferator activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr. Opin. Lipidol.*, 1999, Vol. 10, pp. 151-159.
63. Tovar V., Alsinet C., Villanueva A., Hoshida Y., Chiang D.Y., Solé M., Thung S., Moyano S., Toffanin S., Mínguez B., Cabellos L., Peix J., Schwartz M., Mazzaferro V., Bruix J., Llovet J.M. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J. Hepatol.*, 2010, Vol. 52, pp. 550-559.
64. Trayhurn P., Bing C., Wood I.S. Adipose tissue and adipokines-energy regulation from the human perspective. *J. Nutr.*, 2006, Vol. 136, pp. 1935S-1939S.
65. Uchida K., Kondo M., Takeda S., Osada H., Takahashi T., Nakao A., Takahashi T. Altered transcriptional regulation of the insulin-like growth factor 2 gene in human hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.*, 1997, Vol. 18, pp. 193-198.
66. Villanueva A., Newell P., Chiang D.Y., Friedman S.L., Llovet J.M. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin. Liver Dis.*, 2007, Vol. 27, pp. 55-76.
67. Wang S.N., Chuang S.C., Yeh Y.T., Yang S.F., Chai C.Y., Chen W.T., Kuo K.K., Chen J.S., Lee K.T. Potential prognostic value of leptin receptor in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 2006, Vol. 59, pp. 1267-1271.
68. Wang S.N., Yang S.F., Tsai H.H., Lee K.T., Yeh Y.T. Increased adiponectin associated with poor survival in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 49, no. 9, pp. 1342-1351.
69. Wang S.N., Yeh Y.T., Yang S.F., Chai C.Y., Lee K.T. Potential role of leptin expression in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 2006, Vol. 59, pp. 930-934.
70. Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 112, pp. 1796-1808.
71. Willson T.M., Lambert M.H., Kliewer S.A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, Vol. 70, pp. 341-367.
72. Wu J., Zhu A.X. Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma. *J. Hematol. Oncol.*, 2011, Vol. 4, 30. doi: 10.1186/1756-8722-4-30.

73. Yao N., Yao D., Wang L., Dong Z., Wu W., Qiu L., Yan X., Yu D., Chen J., Sai W., Zhang H., Yang J. Inhibition of autocrine IGFII on effect of human HepG2 cell proliferation and angiogenesis factor expression. *Tumour Biol.*, 2012, Vol. 33, pp. 1767-1776.
74. Yao W.F., Liu J.W., Sheng G.L., Huang D.S. Blockade of IGF-IR exerts anticancer effects in hepatocellular carcinoma. *Mol. Med. Rep.*, 2011, Vol. 4, pp. 719-722.
75. Yu J., Qiao L., Zimmermann L., Ebert M.P., Zhang H., Lin W., Röcken C., Malfertheiner P., Farrell G.C. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*, 2006, Vol. 43, pp. 134-143.
76. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, Vol. 372, pp. 425-432.

Авторы:

Смирнова О.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры медицинской биологии, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Гершкорон Ф.А. — к.б.н., доцент кафедры медицинской биологии, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Authors:

Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Medical Biology, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Gershkoron F.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Medical Biology, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 15.06.2022
Принята к печати 27.06.2022

Received 15.06.2022
Accepted 27.06.2022

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОРНЫХ МОЛЕКУЛ АВТОНОМНОГО И НЕАВТОНОМНОГО ВЛИЯНИЯ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» В КУЛЬТУРЕ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РА

Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Пашкина Е.А., Гришина Л.В.,
Ильина Н.А., Чумасова О.А., Сизиков А.Э., Козлов В.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Известно, что клеточный гомеостаз в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток, при этом апоптоз является наиболее частым и физиологичным, «тихим» механизмом элиминации клеток. В настоящее время показано, что процесс апоптоза, традиционно считавшийся автономным, оказывает выраженное неавтономное влияние на миграцию, пролиферацию, гибель соседних клеток. Основанием для данной работы послужили данные о нарушении программированной гибели моноклеарных клеток у пациентов с ревматоидным артритом, приводящие к формированию аутоиммунного воспаления.

Целью настоящего исследования являлось оценка эффекторных молекул автономного и неавтономного влияния апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом (РА).

Объектом исследования являлись образцы крови пациенток с РА и здоровых женщин сопоставимого возраста. Проводились эксперименты, направленные на выявление уровней основных молекул рецепторного и митохондриального апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro*.

В проведенных ранее исследованиях с применением разработанной нами модели «клеточного соседства» не было установлено различий по параметрам раннего и позднего активационного апоптоза между группами доноров и пациентов с РА. При этом в результате недельной инкубации в апоптотических культурах пациентов значительно увеличилось число живых клеток, несущих маркер пролиферации Ki-67. Различный исход индукции апоптоза в культурах, находящихся в равных условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА, выявил необходимость изучения основных эффекторных молекул апоптоза в исследуемых группах.

Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и фундаментальной иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Address for correspondence:

Tatiana Ya. Abramova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: +7 (383) 227-01-35.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, Е.А. Блинова, Е.А. Пашкина,
Л.В. Гришина, Н.А. Ильина, О.А. Чумасова,
А.Э. Сизиков, В.А. Козлов «Исследование эффекторных
молекул автономного и неавтономного влияния
апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного
соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов
с РА» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.
С. 1119-1138. doi: 10.15789/1563-0625-SOE-2527

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T. Ya. Abramova, E. A. Blinova, E. A. Pashkina, L. V. Grishina,
N. A. Ilina, O. A. Chumasova, A. E. Sizikov, V. A. Kozlov
“Studies of effector molecules exerting autonomous and non-
autonomous influence of T lymphocyte apoptosis under the
conditions of *in vitro* “cell neighborhood” in healthy people
and patients with rheumatoid arthritis”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 6,
pp. 1119-1138. doi: 10.15789/1563-0625-SOE-2527

© Abramova T. Ya. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-SOE-2527

В данном исследовании был установлен низкий потенциал рецепторного пути активации апоптоза за счет подавления продукции TNF α в процессе инкубации клеток в условиях «клеточного соседства» в культурах здоровых людей и низкого изначально и не меняющегося в динамике и в различных вариантах инкубации уровня TNF α в супернатантах пациентов с РА, а также низкого содержания инициирующей каспазы-8 в обеих группах.

Было определено значимое подавление эффекторных молекул митохондриального пути активации апоптоза — антиапоптотического фактора Bcl-2 и транскрипционного фактора p53 в культурах апоптотических клеток, а также смешанных в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток у пациентов с РА и отсутствие динамики по содержанию указанных белков у здоровых людей. При этом между отдельными вариантами культур пациентов с РА относительно здоровых людей по содержанию указанных молекул различий не было установлено. Учитывая, что обе исследуемые группы характеризовались значительной активацией продукции IL-4 и IL-6, цитокинов, обладающих автономными и не автономными защитными и репаративными свойствами, можно заключить, что высокие уровни указанных цитокинов различным образом проявляли себя в культурах клеток, находящихся в условиях «клеточного соседства». Если у здоровых людей нахождение клеток в неблагоприятных условиях сочеталось с поддержанием баланса пролиферации и апоптоза, то у пациентов с РА поддержание указанного баланса активировало процессы пролиферации и сопровождалось увеличением числа живых клеток в апоптотических культурах.

Ключевые слова: молекулы рецепторного апоптоза, молекулы митохондриального апоптоза, автономное влияние апоптоза, неавтономное влияние апоптоза, «клеточное соседство», ревматоидный артрит

STUDIES OF EFFECTOR MOLECULES EXERTING AUTONOMOUS AND NON-AUTONOMOUS INFLUENCE OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS UNDER THE CONDITIONS OF *IN VITRO* “CELL NEIGHBORHOOD” IN HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abramova T.Ya., Blinova E.A., Pashkina E.A., Grishina L.V., Ilina N.A., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Cellular homeostasis in the body is known to be maintained by the processes of cell proliferation and death, whereas apoptosis is the most frequent and physiological, “silent” mechanism of cell elimination. It has been currently shown that the process of apoptosis traditionally considered an autonomous event, has a pronounced non-autonomous effect on migration, proliferation, and death of the neighboring cells. This work was based on the data on impaired programmed death of mononuclear cells from the patients with rheumatoid arthritis (RA) leading to the evolving autoimmune inflammation. The aim of this study was to evaluate effector molecules exerting autonomous and non-autonomous influence of T cell apoptosis under the conditions of “cell neighborhood” in cell cultures of healthy people and RA patients. The studies were performed with blood samples of RA patients and healthy women of comparable age. These experiments were performed in order to assess the levels of main molecules mediating the *in vitro* receptor and mitochondrial apoptosis of T lymphocytes. In previous studies, using the original “cell neighborhood” model, no differences were found in parameters of early and late activation apoptosis between the groups of donors and RA patients. At the same time, 1-week incubation in apoptotic cultures of the patients was followed by significantly increased number of viable cells carrying the proliferation marker Ki-67. Different results of *in vitro* apoptosis induction in cultures under similar conditions of “cell neighborhood” in healthy people and patients with RA have revealed the importance of main effector molecules of apoptosis in the studied groups.

In this study, we have revealed low potential of the receptor pathway for apoptosis activation in healthy people, due to suppression of TNF α production during cell incubation under the conditions of “cell neighborhood”, and in RA patients due to initially low TNF α in supernatants which did not change over time and in various incubation variants, along with low content of initiating caspase 8 in both groups.

Significant suppression of effector molecules of mitochondrial pathway of apoptosis activation, i.e., Bcl-2 anti-apoptotic factor and p53 transcription factor was detected in cultures of apoptotic cells, as well as mixtures of proliferating and apoptotic cells under the conditions of “cell neighborhood” in RA patients. The amounts of these molecules did not change in healthy persons. At the same time, no differences in these molecules were found between individual variants of cell cultures from the patients with RA and healthy people.

The both studied groups were characterized by a significant activation of IL-4 and IL-6 production, i.e., the cytokines with autonomous and non-autonomous protective and reparative properties, Hence, one may conclude that high levels of these cytokines had different effects in cell cultures under the conditions of “cell neighborhood”. Incubation of cells from healthy people under suboptimal conditions was associated with maintaining the balance of proliferation and apoptosis, whereas, in cell cultures of RA patients, this balance caused activation of proliferation processes, being accompanied by an increase in the number of living cells in apoptotic cultures.

Keywords: receptor apoptosis, mitochondrial apoptosis, autonomous influence of apoptosis, non-autonomous influence of apoptosis, “cell neighborhood”, rheumatoid arthritis

Введение

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое воспалительное заболевание, связанное с аномальной активацией фибробластоподобных клеток синовиальной оболочки (ФЛС) с апоптозом, воспалением и окислительным повреждением [37]. Хронический воспалительный процесс, характерный для РА, тем не менее не сопровождается усилением апоптоза, что нарушает клеточный гомеостаз и вызывает формирование аутоиммунного воспаления вследствие нарушения выбраковки аутоспецифичных клонов лимфоцитов [1]. Апоптоз представляет собой регулируемый процесс программируемой клеточной гибели и является необходимым условием нормального существования организма. Процессы пролиферации и апоптоза поддерживают клеточный гомеостаз в организме, обеспечивая физиологическое соотношение клеток различных типов [25].

Помимо основной автономной функции – физиологической гибели клеток и поддержания гомеостаза выявлены неавтономные эффекты апоптоза в отношении соседних клеток – влияние на миграцию, пролиферацию, морфологию, эмбриогенез. Установлено, что апоптотические клетки могут продуцировать и секретировать митогенные сигналы, а также вызывать гибель клеток в окружающих тканях посредством создания механического давления [28].

Исследование ключевых молекул апоптоза, их участия в неавтономных эффектах в норме и при патологии – одно из направлений поиска возможных причин нарушения клеточного гомео-

стаза, в частности избыточной, злокачественной пролиферации синовиоцитов при РА.

Для запуска апоптоза выделяют рецепторные и внутриклеточные сигналы. Как известно, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), доминирующий медиатор воспаления в патогенезе РА, способствует прогрессированию симптомов РА и является внешним фактором, осуществляющим запуск рецепторного варианта апоптоза через семейство TNF-рецепторов. Специализированные рецепторы из семейства TNF для индукции апоптоза – CD95 (Fas/Apo-1), TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2Hflp, DR3, DR6, EDA-R и NGF-R, находятся на цитоплазматической мембране клеток [16]. Апоптоз, опосредованный рецептором CD95, Fas и другими членами данного семейства, образует мультибелковый комплекс, необходимый для взаимодействия с обязательными для индукции апоптоза адапторными молекулами, в том числе с доменом цитозольного проэнзима прокаспазы 8. Помимо основной, автономной функции запуска рецепторного апоптоза, активация TNF α опосредованно активирует пролиферативные процессы. Так, в работе [24] было установлено, что опухолевый супрессор JNK, активируемый консервативной передачей сигналов TNF α , способен неавтономно влиять на микроокружение опухоли, воздействуя на транскрипцию различных молекул, способствующих росту и пролиферации клеток. А в работе [36] было определено, что TNF α способствовал пролиферации клеток синовиоцитов у пациентов с РА посредством подавления экспрессии PDCD5. PDCD5 может быть вовлечен в аномальную про-

лиферацию синовиоцитов и дегенерацию хондроцитов, стимулированную TNF α .

Неотъемлемой частью регуляции и инициации опосредованной рецепторами смерти активации запрограммированной гибели клеток является аспартат-специфичная цистеиновая протеаза (каспаза) 8. В результате аутопротелитической активации прокаспазы-8 следует образование активной формы иницирующей каспазы-8, которая запускает активацию эффекторных каспаз-3, -6, -7. Разрушение субстратов данными каспазами приводит к клеточной гибели. Помимо инициации апоптоза, лигирование рецепторов смерти также может вызывать некроптоз, при котором не происходит фрагментация ДНК, а гибель клетки по механизму некроптоза вызывает мощный иммунный ответ, в том числе и пролиферацию. Внешние пути апоптоза и некроптоза регулируют друг друга [16]. В другом исследовании характеризуют каспазу 8 как молекулярный переключатель, контролирующий апоптоз, некроптоз и пироптоз и предотвращающий повреждение тканей во время эмбрионального развития и взросления [12].

Регуляция апоптоза белками семейства Bcl-2 осуществляется преимущественно на отрезке митохондриального сигнального пути, поскольку сигналы рецептор-зависимого сигнального пути в основном не нуждаются во влиянии стороны Bcl-2. Митохондриальный, а не рецепторный путь активации апоптоза является наиболее частым вариантом клеточной гибели. При этом происходит выход белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму. В регуляции апоптоза большая роль принадлежит белкам семейства Bcl. Различают агонистов (Bax, Bad, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk, Mtd) и антагонистов (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A-1, Bcl-2) активности апоптотической гибели клетки. Решающее значение в реализации апоптоза имеет соотношение про- и антиапоптозных белков. Имеются данные о возрастном снижении антиапоптотического белка Bcl-2 [15].

Как известно, сигналом нерцепторного апоптоза служит изменение потенциала и стабильности мембраны митохондрий, вызванное проапоптогенными белками семейства bcl-2 и белка p53, который активируется при нарушении клеточного цикла. Онкосупрессор p53 – внутриклеточный фактор, осуществляющий надзор за клеточным гомеостазом. Большинство мутаций гена p53 приводят к потере его функций, вызывающих апоптоз и старение [21]. В дополнение к автономным эффектам p53 существуют данные, свидетельствующие об усилении функции или активации неавтономных путей, которые прямо или косвенно способствуют онкогенезу. В настоящее

время признается, что дисфункция p53 в различных клеточных компартментах ТМЕ приводит к иммуносупрессии и уклонению от иммунитета. Обнаружена функциональная связь между молекулами, осуществляющими апоптоз – уровнями апоптоза, эффекторными каспазами, белком p53 и низким содержанием белка Bcl-xl [11], а в работе [36] связывают недостаточную экспрессию Bax, сверхэкспрессию p53 и высокое отношение Bcl-2 к Bax с карциномой эндометрия.

Установлено, что IL-6 может способствовать усилению апоптоза, индуцированного TNF α или TRAIL, посредством p53-зависимой повышающей регуляции DR-4 и DR-5 [30]. Значительна роль IL-6 в его влиянии на автономные и неавтономные эффекты апоптоза. IL-6 представляет собой плеiotропный цитокин, характер функциональной активности которого (воспалительной или противовоспалительной) зависит от типа сигналинга и до конца не изучен. Классический сигналинг происходит в клетках, которые имеют IL-6R и gp130 на своей мембране, и опосредует регенеративную и противовоспалительную активность. Для транссигналинга необходимо наличие растворимой формы sIL-6R. Предполагается, что кластерный вариант сигналинга необходим для дифференцировки наивных Т-лимфоцитов [11]. Было показано, что IL-6 индуцирует альтернативную активацию макрофагов. В отличие от классически активированных макрофагов (M1), отвечающих за усиление воспалительной реакции, альтернативно активированные макрофаги (M2) обеспечивают регенеративные процессы в поврежденных тканях, продуцируя противовоспалительные цитокины IL-10 и TGF- β . Активация M2-макрофагов происходит при воздействии IL-4 [11].

Цитокины IFN γ и IL-4 исполняют множество биологических функций, в числе которых важнейшей является взаимная регуляция провоспалительной функции Th1 интерлейкином-4 посредством снижения продукции IFN γ и снижение противовоспалительной активности Th2 за счет подавления IL-4 интерфероном гамма. Активная передача сигналов IFN γ может непосредственно запускать апоптоз и остановку клеточного цикла. В литературе представлены данные, свидетельствующие о возможности регуляции апоптоза посредством ингибирования стресса эндоплазматического ретикулума, вызванного IFN γ [9]. Тканевая трансглутаминаза (TG2), кальций-зависимый сшивающий фермент, была описана как маркер противовоспалительных, интерлейкин-4 (IL-4) поляризованных макрофагов (M (IL-4)), которые представляют субпопуляцию макрофагов с фагоцитарной способностью. В макрофагально-дифференцированных моноцитах THP-1

уровень TG2 повышался при обработке IL-4 [31]. Обзор литературы, посвященный основным эффекторным молекулам апоптоза, свидетельствует о неоднозначности их влияния, наличии не только автономных, но и различных неавтономных функций у данных белков.

Целью настоящего исследования являлась оценка эффекторных молекул автономного и неавтономного влияния апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов с РА.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась периферическая кровь 10 условно здоровых женщин, не имеющих аутоиммунных, острых и обострения хронических заболеваний, средний возраст группы составил 48,1±3,9 лет а также периферическая кровь 9 женщин больных РА (средний возраст 52,5±3,8 лет), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ, г. Новосибирска. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций (приложение № 1).

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры. Первый вариант («нормально пролиферирующая CFSE+ культура» (НП)) – 7 лунок по $5,0 \times 10^5$ кл/0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (Molecular probes, США), (CFSE+). В составе ПКС – среда RPMI-1640 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), тиенам, (ЗАО ОПТАТ, Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik, GmbH, Германия), буферный раствор Нерес (GERBU, Biotechnik, GmbH), фетальная телячья сыворотка (FCS), (Hu Clone, США). Вторым вариантом – «апоптотическая CFSE-культура» (АК) – 3 лунки (нестимулированные клетки, aCD3 (1 мкг/мл, МедБиоСпектр, Москва), и дексаметазон-стимулированные (1×10^{-4} М) клетки) по 2×10^6 кл/150,0 мкл обедненной среды (ОС) – 1% FCS – (CFSE-). На 4-е сутки инкубации (96 h) в термостате (37 С, 5% CO₂) апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС (приложение № 2). Далее проводилось сокультивирование проб, получивших условные названия: 1 – «Контроль» – контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2 – «Контроль апоптоза» – к НП лимфоцитам была добавлена клеточная часть нестимулированных клеток АК; 3 – «Контроль апоптоза супернатант» – сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от нестиму-

лированной АК; 4 – «aCD3» – НП культура и клетки АК, стимулированные aCD3; 5 – «aCD3 супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, стимулированной aCD3; 6 – «Деха» – сокультивирование НП лимфоцитов в ПКС и АК, обработанной дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7 – «Деха супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном (приложение № 3).

Контроль апоптотических проб в динамике проводился на 4-е сутки (96 ч) и 7-е сутки (168 ч) в пробах «КА», «aCD3» и «Деха».

На 7-е сутки каждая проба – супернатант и клетки отдельно – замораживалась и хранилась в холодильнике до использования при t° -80 °С. Клеточная часть культуры предварительно смешивалась с раствором альбумина человека (ФГУП «НПО Микроген г. Томск», содержащим 10% DMSO (SIGMA)).

Определение содержания TNFα (пг/мл) в супернатантах клеток проводилось с помощью набора для иммуноферментного анализа АО «Вектор-Бест» (ИФА-БЕСТ), набор реагентов А-8756, р. п. Кольцово, Новосибирская область, согласно инструкции по применению. В определении концентрации IL-6 (пг/мл) (А-8768), IFNγ (пг/мл) (А-8752), IL-4 (пг/мл) (А-8754) в супернатантах также были использованы наборы ИФА-БЕСТ, в соответствии с прилагаемой инструкцией. В лизатах клеток в соответствии с прилагаемым протоколом испытаний определялось содержание внутриклеточных компонентов – каспазы-8 (нг/мл), Human Caspase 8 ELISA Kit, invitrogen; Human p53 (Ед/мл) ELISA Kit, invitrogen; ab119506 – Bcl-2 (нг/мл), Human ELISA Kit, abcam.

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики (Statistica 6.0). В анализе был использован U-критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), возраст представлен в виде M±m. Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне p ≤ 0,05.

Результаты

Установленное нами ранее увеличение числа живых клеток в апоптотических культурах больных РА на фоне отсутствия, относительно здоровых людей, значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, а также высокий уровень содержания клеток, несущих маркер пролиферации Ki-67, свидетельствовало о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

Выявление факторов неавтономного влияния апоптоза в сложной системе «клеточного соседства» апоптотизирующих и пролиферирующих клеток привело к необходимости изучения возможных функциональных дефектов эффекторных молекул апоптоза у пациентов с РА относительно здоровых людей.

Фактор некроза опухоли (TNF α) – мощный провоспалительный цитокин, включенный в иммунный ответ, является основным фактором, осуществляющим запуск рецепторного варианта апоптоза [16].

В наших исследованиях было установлено, что здоровых людей изначально характеризует более высокий уровень TNF α (единицы измерения пг/мл) в культурах Т-лимфоцитов относительно пациентов с РА. Так, при исследовании уровня цитокина в супернатантах клеточных культур было выявлено более высокое содержание TNF α не только в контроле пролиферирующих кле-

ток (проба «К») у здоровых людей относительно аналогичных культуры пациентов с РА, но также в контроле сокультивированных пролиферирующих и апоптотизирующих клеток (проба «КА»). Аналогичные различия между группами доноров и пациентов были установлены в пробе «Деха» – сокультивированных пролиферирующих и апоптотизирующих мононуклеаров, стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) (рис. 1).

В процессе инкубации в клеточных культурах здоровых людей было установлено снижение содержание TNF α относительно контроля «К» (1) в пробах «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), а также в пробах «Деха» (96 ч) и «Деха» (168 ч). Аналогичный характер различий был выявлен относительно пробы «КА» (2) – в пробах «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), «Деха» (96 ч), «Деха» (168 ч) (табл. 1).

Кроме того, значимое снижение уровня TNF α в культурах здоровых людей было выявлено в динамике культивирования в пробах "Деха" (96 ч) – 12,03 (5,1 ÷ 66,7), $p = 0,005$ и "Деха" (168 ч) – 38,1 (2,9 ÷ 82,9), $p = 0,023$ относительно пробы «Деха» 185,6 (92,5 ÷ 395,5). В культурах пациентов с РА не было установлено значимой динамики в содержании TNF α в процессе инкубации.

Снижение уровня TNF α в культурах доноров в процессе инкубации в неблагоприятных условиях и относительно низкое изначально содержание цитокина у пациентов с РА могло послужить причиной низкой активности каспазы 8 как у здоровых, так и у больных людей.

Исследование содержания каспазы-8 (единицы измерения нг/мл), иницирующей каспазы внешнего контура запуска процессов рецепторного апоптоза, выявило отсутствие различий по уровню фермента в лизатах Т-лимфоцитов между группами доноров и пациентов с РА. Была определена лишь тенденция, свидетельствующая о более высоком содержании у здоровых людей в пробе ("Деха sup"). Также не было установлено значимой динамики, зависящей от применяемых стимулов и времени инкубации, ни у здоровых людей, ни у пациентов с РА.

Одним из самых важных моментов в митохондриальном пути клеточной гибели является включение белков семейства Bcl. При определении в лизатах клеток содержания антиапоптотического фактора из группы Bcl – Bcl-2 (единицы измерения – нг/мл) не было установлено значимых различий между контрольной группой и группой больных. При этом в группе пациентов с РА относительно пробы «К» было определено значимое снижение уровня Bcl-2 в пробах, содержащих клетки апоптотических культур, как не стимулированных – проба «КА», так и в стимулированных – проба «аCD3», в пробе «Деха», пробе «аCD3» (168 ч) и пробе «Деха» (168 ч) (табл. 2).

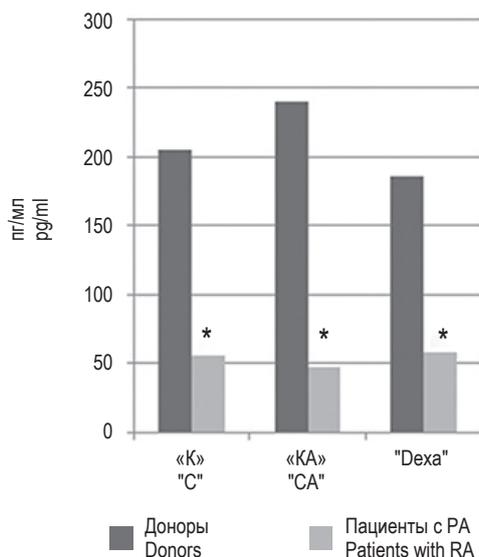


Рисунок 1. Содержание TNF α в супернатантах Т-клеточных культур здоровых людей и пациентов с РА

Примечание. $n = 14$; * – $p \leq 0,05$; единицы измерения – пг/мл. Образец «С», контроль пролиферирующих клеток; образец «СА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; образец «Деха», инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) апоптотических клеток.

Figure 1. Concentration of TNF α in supernatants of T cell cultures of healthy people and patients with RA

Note. $n = 14$; * – $p \leq 0,05$; units of measurement – pg/mL.

Sample "С", control of proliferating cells; sample "СА", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; sample "Деха", incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by dexamethasone (1×10^{-4} M) apoptotic cells.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ TNF α В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2) У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF TNF α IN THE SUPERNATANTS OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION UNDER CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2) IN HEALTHY PEOPLE

	К / С (1) 204,9 (99,9 ÷ 465,6)		КА / СА (2) 240,1 (107,0 ÷ 421,2)
КА (96 ч) / СА (96 h) 61,2 (24,1 ÷ 117,4)	p = 0,04	КА (96 ч) / СА (96 h) 61,2 (24,1 ÷ 117,4)	p = 0,021
КА (168 ч) / СА (168 h) 53,3 (27,1 ÷ 71,06)	p = 0,01	КА (168 ч) / СА (168 h) 53,3 (27,1 ÷ 71,06)	p = 0,01
Деха (96 ч) / Деха (96 h) 12,03 (5,1 ÷ 66,7)	p = 0,007	Деха (96 ч) / Деха (96 h) 12,03 (5,1 ÷ 66,7)	p = 0,005
Деха (168 ч) / Деха (168 h) 38,1 (2,9 ÷ 82,9)	p = 0,022	Деха (168 ч) / Деха (168 h) 38,1 (2,9 ÷ 82,9)	p = 0,023

Примечание. n = 7, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), единицы измерения – пг/мл.

Образец «К», контроль пролиферирующих клеток; образец «КА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), нестимулированные апоптотические лимфоциты, время инкубации – 96, 168 часов; образец «aCD3» (96 ч), апоптотические, стимулированные aCD3 лимфоциты, время инкубации 96 часов; образцы «Деха» (96 ч) (168 ч), апоптотические, стимулированные дексаметазоном (1 × 10⁻⁴М) лимфоциты, время инкубации 96, 168 часов.

Note. n = 7, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), measure units – pg/mL. Sample "C", control of proliferating cells; sample "CA", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; "CA" (96 h), "CA" (168 h), unstimulated apoptotic lymphocytes, incubation time – 96, 168 hours; sample "aCD3" (96 h), apoptotic, aCD3-stimulated lymphocytes, incubation time 96 hours; samples "Dexa" (96 h) (168 h), apoptotic, dexamethasone-stimulated (1 × 10⁻⁴M) lymphocytes, incubation time 96, 168 hours.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЕ BCL-2 В ЛИЗАТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» У ПАЦИЕНТОВ С РА ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2)

TABLE 2. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF BCL-2 IN LYSATES OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION UNDER CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" IN PATIENTS WITH RA RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2)

	К / С (1) 13,7 (7,8 ÷ 19,9)		КА / СА (2) 1,42 (0,7 ÷ 2,2)
КА / СА 1,42 (0,7 ÷ 2,2)	p = 0,012	–	
aCD3 1,5 (1,2 ÷ 2,9)	p = 0,012	aCD3 1,5 (1,2 ÷ 2,9)	p > 0,05
aCD3 (168 ч) / aCD3 (168 h) 0,00 (0,00 ÷ 0,00)	p = 0,009	aCD3 (168 ч) / aCD3 (168 h) 0,0 (0,0 ÷ 0,0)	p = 0,052
Деха 0,48 (0,00 ÷ 1,60)	p = 0,013	Деха 0,48 (0,00 ÷ 1,60)	p > 0,05
Деха (168 ч) / Деха (168 h) 1,13 (0,17 ÷ 3,10)	p = 0,019	Деха (168 ч) / Деха (168 h) 1,13 (0,17 ÷ 3,10)	p > 0,05

Примечание. n = 5, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), единицы измерения – нг/мл.

Образец «К», контроль пролиферирующих клеток; образец «КА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; образец «aCD3», инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующей и стимулированной aCD3 апоптотической клетки; образец «Деха», инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и стимулированных дексаметазоном (1×10⁻⁴ м) апоптотических клеток; образец «aCD3» (168 ч), апоптотические, стимулированные aCD3 лимфоциты, время инкубации 168 часов; образец «Деха» (168 ч), апоптотические, стимулированные дексаметазоном (1 × 10⁻⁴М) лимфоцитов, время инкубации 168 часов.

Note. n = 5, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), measure units – ng/mL. Sample "C", control of proliferating cells; sample "CA", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; sample "aCD3", incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by aCD3 apoptotic cell; sample "Dexa", incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by dexamethasone (1 × 10⁻⁴M) apoptotic cells; sample "aCD3" (168 h), apoptotic, aCD3-stimulated lymphocytes, incubation time 168 hours; sample "Dexa" (168 h), apoptotic, dexamethasone-stimulated (1 × 10⁻⁴M) lymphocytes, incubation time 168 hours.

Относительно пробы «аCD3» – 1,5 (1,2 ÷ 2,9), понизилось содержание Vcl-2 в пробе «аCD3» (168 ч), 0,00 (0,00 ÷ 0,00) p = 0,052.

Определение уровня Vcl-2 в лизатах пролиферирующих клеток, со культивированных с супернатантами от апоптотических культур в пробах «КА супернатант», «аCD3 супернатант», «Деха супернатант» выявило понижение содержания Vcl-2 в меньшей степени – на уровне тенденций. Относительно второй контрольной пробы – «КА» также было определено снижение Vcl-2 в пробе «аCD3» (168 ч).

В группе здоровых людей не было установлено значимой динамики содержания Vcl-2 в культурах, зависящих от характера стимуляции и времени инкубации.

Важнейшим фактором, регулирующим клеточную гибель, является белок p53 (единицы измерения – Ед/мл), это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. Исследование внутриклеточного содержания белка p53 выявило отсутствие различий между группами больных РА и здоровыми людьми. При этом в культурах пациентов относительно контроля – пробы «К» 1,73 (1,47 ÷ 1,96) было установлено выраженное снижение содержания указанного белка в пробе «КА» – 0,16 (0,1 ÷ 0,3), p = 0,02; в пробе «Деха» 0,0 (0,0 ÷ 0,016), p = 0,01 и в пробе «Деха 168 ч» – 0,0 (0,0 ÷ 0,013), p = 0,017. В этой же группе пациентов относительно контроля апоптоза «КА» – 0,16 (0,1 ÷ 0,3) было определено

повышение содержания p53 в пробе «CD3sup» 2,5 (1,6 ÷ 2,8), p = 0,012. Учитывая последние данные, а также результаты, свидетельствующие о различиях между пробами «К» и «КА», можно предположить, что именно контакт с апоптотирующими клетками в условиях «клеточного соседства» ингибирует содержание транскрипционного фактора в культурах лимфоцитов больных РА.

Определение вклада ИЛ-6 (единицы измерения – пг/мл) в автономные и неавтономные эффекты апоптоза в процессе совместной инкубации пролиферирующих и апоптотирующих клеток выявило отсутствие различий по уровню цитокина между группами здоровых людей и пациентами с РА. В динамике инкубации в обеих группах были установлены сходные изменения, имеющие однонаправленный характер и свидетельствующие о выраженной стимуляции относительно контроля продукции ИЛ-6 во многих исследуемых вариантах культуры, как у здоровых людей, так и у пациентов с РА. Различия заключались в следующем – у здоровых людей, в отличие от пациентов, на уровне тенденции определялись различия по параметрам цитокина в апоптотической культуре «Деха» (96 ч) относительно контроля «К» (табл. 3).

В группе пациентов с РА характер тенденции носили различия группы контроля «К» относительно не стимулированных клеток в пробах контроль апоптоза «КА» (96 ч) (табл. 4).

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ИЛ-6 В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2) У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 3. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF IL-6 IN THE SUPERNATANTS OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION UNDER CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2) IN HEALTHY PEOPLE

	К / С (1) 589,0 (228,0 ÷ 842,3)		КА / СА (2) 827,2 (640,7 ÷ 882,8)
КА (96 ч) / СА (96 h) 1807,9 (1623,8 ÷ 3096,0)	p = 0,0022	КА (96 ч) / СА (96 h) 1807,9 (1623,8 ÷ 3096,0)	p = 0,0021
аCD3 (96 ч) / аCD3 (96 h) 1895,9 (1695,8 ÷ 3038,2)	p = 0,002	аCD3 (96 ч) / аCD3 (96 h) 1895,9 (1695,8 ÷ 3038,2)	p = 0,002
КА (168 ч) / СА (168 h) 2618,2 (1874,8 ÷ 3339,1)	p = 0,001	КА (168 ч) / СА (168 h) 2618,2 (1874,8 ÷ 3339,1)	p > 0,05
Деха (96 ч) / Деха (96 h) 1435,6 (688,07 ÷ 2535,80)	p = 0,07	Деха (96 ч) / Деха (96 h) 1435,6 (688,07 ÷ 2535,80)	p > 0,05

Примечание. n = 7, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), единицы измерения – пг/мл.

Образец «К», контроль пролиферирующих клеток; образец «КА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), нестимулированные апоптотические лимфоциты, время инкубации 96, 168 часов; образец «аCD3» (96 ч), апоптотические, стимулированные аCD3 лимфоциты, время инкубации 96 часов; образец «Деха» (96 ч), апоптотические, стимулированные дексаметазоном (1 × 10⁻⁴ м) лимфоциты, время инкубации 96 часов.

Note. n = 7, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), measure units – pg/mL. Sample "C", control of proliferating cells; sample "CA", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; "CA" (96 h), "CA" (168 h), unstimulated apoptotic lymphocytes, incubation time 96, 168 hours; sample "aCD3" (96 h), apoptotic, aCD3-stimulated lymphocytes, incubation time 96 hours; sample "Dexa" (96 h), apoptotic, dexamethasone-stimulated (1 × 10⁻⁴M) lymphocytes, incubation time 96 hours.

ТАБЛИЦА 4. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ IL-6 В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2) У ПАЦИЕНТОВ С РА

TABLE 4. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF IL-6 IN THE SUPERNATANTS OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION IN THE CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2) IN PATIENTS WITH RA

	К / С (1) 485,1 (148,9÷567,3)		КА / СА (2) 563,5 (199,2÷639,7)
КА (96 ч) / CA (96 h) 2399,3 (1616,2 ÷ 2603,9)	p = 0,07	КА (96 ч) / CA (96 h) 2399,3 (1616,2 ÷ 2603,9)	p = 0,07
aCD3 (96 ч) / aCD3 (96 h) 2794,9 (2621,2 ÷ 2994,3)	p = 0,006	aCD3 (96 ч) / aCD3 (96 h) 2794,9 (2621,2 ÷ 2994,3)	p = 0,01
Деха (96 ч) / Dеха (96 h) 2496,7 (1955,7 ÷ 2666,1)	p = 0,01	Деха (96 ч) / Dеха (96 h) 2496,7 (1955,7 ÷ 2666,1)	p = 0,010
КА (168 ч) / CA (168 h) 1567,3 (1008,6 ÷ 2774,2)	p = 0,005	КА (168 ч) / CA (168 h) 1567,3 (1008,6 ÷ 2774,2)	p = 0,0053

Примечание. См. примечание к таблице 3.

Note. As for Table 3.

Кроме того, у пациентов с РА было выявлено значимое повышение продукции IL-6 на стимуляцию дексаметазоном, не только относительно проб «К» и «КА», но и относительно пробы «Деха» 521,6 (177,5 ÷ 694,5) параметров пробы «Деха» (96 ч) – 2496,7 (1955,7 ÷ 2666,1), p = 0,01.

В супернатантах клеточных культур нами были определены уровни IFN γ и IL-4 с целью установления функциональной активности мононуклеаров в процессе инкубации в условиях «клеточного соседства».

Проведенные исследования свидетельствовали об отсутствии различий по содержанию IFN γ (единицы измерения – пг/мл) в супернатантах культур здоровых людей и пациентов с РА, при этом значимое повышение уровня IFN γ относительно двух видов контроля было установлено в группе здоровых людей после добавления клеток от aCD3⁺ апоптотической культуры. А в культурах пациентов, после добавления супернатанта от aCD3⁺ апоптотической культуры. Так, у здоровых людей было определено повышение содержания цитокина в пробах апоптотических культур, стимулированных aCD3 – (aCD3 96 ч) относительно контроля «К» – 4862,5 (416,8 ÷ 7816,0) и 4,2 (0,00 ÷ 23,9), соответственно, p = 0,049. Сходные различия по содержанию IFN γ были выявлены также в пробе «aCD3» (96 ч) относительно пробы контроль апоптоза «КА» 4862,5 (416,8 ÷ 7816,0) и 7,9 (0,00 ÷ 23,5) соответственно, p = 0,049.

У пациентов с РА также было установлено достоверное повышение содержания IFN γ в супернатантах культуры Т-лимфоцитов при совместном культивировании пролиферирующих клеток и супернатанта от aCD3 апоптотирующей куль-

туры (проба «aCD3sup») относительно пробы «К» 1469,5 (733,9 ÷ 1757,4) и 0,00 (0,00 ÷ 0,95) соответственно, p = 0,027; а также относительно пробы «КА» 1469,5 (733,9 ÷ 1757,4) 0,00 (0,00 ÷ 0,73) p = 0,027.

В супернатантах исследуемых культур нами были определены сходные изменения – повышение уровня IL-4 (единицы измерения – пг/мл) во многих вариантах культур, как у здоровых людей, так и у пациентов с РА. Значимое повышение уровня цитокина у здоровых людей относительно пробы «К» 0,00 (0,00 ÷ 0,81) было установлено в пробе «aCD3» (96 ч) – 99,0 (19,4 ÷ 102,2), p = 0,043; в пробе «Деха» (96 ч) – 74,3 (39,2 ÷ 99,0), p = 0,043; в пробе «aCD3» (168 ч) – 48,5 (18,6 ÷ 91,3), p = 0,044. У здоровых людей также было выявлено повышение уровня IL-4 относительно пробы «КА» – 2,4 (0,85 ÷ 29,1) в пробе – «aCD3» (96 ч), p = 0,049; в пробе «Деха» (96 ч), p = 0,049; в пробе «aCD3» (168 ч), p = 0,049. Кроме того, длительная инкубация апоптотических aCD3-стимулированных культур также повышала уровень цитокина относительно пробы «aCD3» (пролиферирующие и апоптотирующие клетки) – 0,4 (0,00 ÷ 2,025), при инкубации (96 ч), p = 0,049; и при инкубации (168 ч), p = 0,049. В пробе апоптотирующих клеток «Деха» (96 ч) также был установлен более высокий уровень IL-4 относительно пробы «Деха» – пролиферирующие и апоптотирующие клетки в условиях «клеточного соседства» 0,00 (0,00 ÷ 0,59), p = 0,044.

В культурах клеток больных РА было определено аналогичное повышение содержания IL-4 в стимулированных пробах относительно пробы «К» – 0,00 (0,00 ÷ 1,66). В частности, в пробе

«аCD3» (96 ч) 31,4 (31,06 ÷ 111,1), $p = 0,04$; в пробе «аCD3» (168 ч) – 52,2 (30,0 ÷ 177,8), $p = 0,027$; в пробе «Деха» (168 ч) – 49,7 (28,7 ÷ 133,0), $p = 0,026$. Относительно пробы «КА» – 2,1 (0,10 ÷ 4,2) определено повышение в пробах «аCD3» (96 ч), $p = 0,051$; «аCD3» (168 ч), $p = 0,03$; «Деха» (168 ч) $p = 0,03$. У пациентов, так же как у здоровых людей, повышен уровень IL-4 в пробе «аCD3» (96 ч), $p = 0,051$ и в пробе «аCD3» (168 ч), $p = 0,03$ относительно «аCD3» – 4,5 (2,2 ÷ 12,3). В пробе апоптозирующих клеток «Деха» (168 ч) был выявлен более высокий уровень IL-4 относительно пробы «Деха» – «клеточное соседство» пролиферирующих и апоптозирующих стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) клеток -1,49 (0,6 ÷ 4,8), $p = 0,03$.

Обсуждение

Литературные данные о неавтономных эффектах апоптоза, обусловленные «клеточным соседством», позволили нам предположить, что особенности или нарушение процессов взаимодействия апоптозирующих и пролиферирующих клеток могут являться потенциальными механизмами развития и поддержания патологического воспаления при РА [17].

На предыдущих этапах работы нами была разработана модель «клеточного соседства», в которой, *in vitro* совместно культивировались клеточные и гуморальные компоненты культуры, подвергнутой наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и аутологичные клетки, пролиферирующие в полной культуральной среде. Применение модели выявило отсутствие различий по уровню активационного апоптоза в культурах Т-лимфоцитов, находящихся в условиях «клеточного соседства», стимулированных и не стимулированных, пролиферирующих и апоптозирующих клеток между группами здоровых людей и пациентов с РА. При этом на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, было установлено увеличение числа живых клеток, а также повышение числа клеток несущих маркер пролиферации Ki-67 в апоптотических культурах больных РА относительно показателей здоровых людей, что свидетельствовало о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА. Полученные результаты поставили перед необходимостью изучения ключевых молекул апоптоза и их возможное участие в неавтономных эффектах в условиях «клеточно-

го соседства» пролиферирующих и апоптозирующих клеток у больных РА и здоровых людей.

Из двух наиболее изученных путей апоптоза, внешнего (рецепторного) и внутреннего (митохондриального) первый индуцируется лигированием рецепторов смерти надсемейства рецепторов TNF (TNFR), а фактор некроза опухоли- α (TNF α) играет ключевую роль, вмешиваясь в проапоптотический путь лиганда Fas-Fas (FasL) [16, 26]. Полученные в данной работе результаты свидетельствовали о том, что здоровых людей относительно пациентов с РА характеризует высокий уровень TNF α в культурах пролиферирующих клеток или находящихся в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптозирующих лимфоцитов. А в процессе инкубации апоптотических, как стимулированных, так и не стимулированных культур доноров продукция TNF α подавлялась. Относительно высокие уровни TNF α и отсутствие различий между пробами «К», содержащей пролиферирующие клетки и «КА», в которой культивировались пролиферирующие и апоптозирующие Т-лимфоциты в культурах здоровых людей, свидетельствует о функциональной активности мононуклеаров, находящихся в неблагоприятных условиях.

В то же время изначально низкое, относительно здоровых людей, содержание TNF α в супернатантах культур пациентов с РА не выявило достоверных изменений в динамике инкубирования всех вариантов Т-клеточных культур – пролиферирующих, апоптозирующих и находящихся в условиях «соседства» пролиферирующих и апоптозирующих клеток, что, с учетом полученном нами ранее увеличении числа живых клеток в апоптотической культуре в процессе инкубации может свидетельствовать о наличии факторов пролиферации, поддерживающих изначально высокий клеточный уровень клеток, длительно находящихся в неблагоприятных условиях у пациентов с РА.

Существуют различные данные, выявляющие помимо основных, автономных функций TNF α – многофункционального цитокина, участвующего в гомеостазе иммунной системы, антимикробной защите, регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировке клеток, обеспечивать некоторые неавтономные процессы [19]. Так, известно, что первоначально TNF α синтезируется в виде полноразмерной трансмембранной формы, которая ферментативно расщепляется с образованием растворимого циркулирующего TNF α . Трансмембранная форма цитокина остается биологически активной и способна инициировать сигнальные каскады после связывания с рецеп-

торами $\text{TNF}\alpha$ – TNFR I и TNFR II . Она обладает потенциалом регрессии опухоли без инициации клеточной пролиферации. В то время как функция растворимой формы цитокина зависит от варианта специфического рецептора, с которым он устанавливает связь, и его двойная способность стимулировать рост опухоли представляла собой серьезное препятствие для его признания в качестве противораковой молекулы [4]. Относительно аутоиммунных заболеваний, в частности РА, были получены несколько иные данные – растворимая форма цитокина solTNF передает сигналы в основном через TNFR1 , который широко экспрессируется и способствует главным образом воспалению и апоптозу. В то время как трансмембранная форма цитокина передает сигналы в основном через TNFR2 , который ограничен иммунными и эндотелиальными клетками, активирует сигнальный путь PI3K-Akt/PKB , поддерживает функцию регуляторных клеток и способствует выживанию Т-лимфоцитов [26]. Следующий возможный вариант подавления апоптоза – вариант сплайсинга гена DR3 , который содержит четыре однонуклеотидных полиморфизма (SNP) и 14-нуклеотидную делецию в экзоне 5 и интроне 5. Измененный ген смерти DR3 , – член семейства Fas , индуцирующего апоптоз, обнаружен при анализе последовательностей ДНК у пациентов с РА. Укороченный белковый продукт гена не содержит домен смерти, образуя гетеротримерный комплекс с DR3 дикого типа и он доминантно-негативно ингибирует индуцированный лигандом апоптоз в лимфоцитах, чем может способствовать патогенезу РА [13]. Еще одним важным фактором поддержания клеточного постоянства в ситуации индукции апоптоза, в частности при хроническом воспалительном заболевании, является аутофагия. Известно, что $\text{TNF}\alpha$ индуцирует как апоптоз, так и аутофагию в остеобластах, а усиленная аутофагия защищает клетку, уменьшая апоптоз, индуцированный $\text{TNF}\alpha$ [2, 38]. Скрининг нокаута CRISPR в геноме мыши идентифицирует передачу сигналов $\text{TNF}\alpha$ опухолевыми клетками как важный компонент апоптоза, индуцированного Т-лимфоцитами, с передачей сигналов $\text{NF-}\kappa\text{B}$ и аутофагией в качестве основных защитных механизмов. Как известно, аутофагия функционирует на относительно раннем этапе сигнального пути $\text{TNF}\alpha$, ограничивая активацию FADD -зависимой каспазы-8 [34]. В упоминаемой нами ранее работе было сделано заключение, что помимо основной, автономной функции запуска рецепторного апоптоза, активация $\text{TNF}\alpha$ опосредованно активирует пролиферативные процессы, в частности, активируемые

им молекулы обладают способностью неавтономно влиять на микроокружение, воздействуя на транскрипцию различных молекул, способствующих росту и пролиферации клеток [24].

Снижение уровня $\text{TNF}\alpha$ в культурах доноров в процессе инкубации в неблагоприятных условиях и относительно низкое изначально содержание цитокина у пациентов с РА могло послужить причиной низкой активности каспазы-8, как у здоровых, так и у больных людей.

Апоптоз, индуцированный CD95 (Fas/APO-1) и $\text{TNF}\alpha$ активирует каспазу-8 (MACH/FLICE/Mch5), обеспечивая, таким образом, прямую связь между рецепторами клеточной смерти и каспазами, т. е. каспаза 8 находится на вершине апоптозного каскада [29]. Кроме активации CD95 , показано расщепление каспазы-8 гранзимом В и даже аутоактивации каспазы-8 в процессе апоптоза, индуцированного Т-лимфоцитами. Эти потенциально летальные ферменты могут служить множеству неапоптотических целей. В частности, стимулировать клеточную пролиферацию, которая может происходить как в результате апоптоза, так и в устойчивых к апоптозу клетках. Одним из возможных вариантов индукции пролиферации вместо апоптоза в стимулированных каспазой-8 лимфоцитах может быть компартментальная активация фермента, приводящая к активации $\text{NF-}\kappa\text{B}$ и ядерной транслокации [29]. Помимо пролиферации, которая является установленным неавтономным следствием активации каспазы, а митогенные сигналы генерируются каспаз-экспрессирующими клетками, были описаны и другие зависимые от каспаз исходы. В частности, такие, как регулирование гибели и выживания соседних клеток различными способами, одним из которых является продукция PDGF/VGF -подобного белка Pvf , запускающего активацию антиапоптотической микроРНК-бантам в окружающих клетках, явление, получившее название эффекта Махакали, что придает повышенную устойчивость к уничтожению клеток. С другой стороны, апоптоз также может вызывать дальнейшую гибель клеток в окружающих тканях. Это явление, известное как апоптоз, индуцированный апоптозом (AiA), зависит от продукции $\text{TNF}\alpha$ умирающими клетками, который активирует JNK в соседних клетках, что приводит к их гибели в результате апоптоза [14].

Нами не было выявлено повышения активности основных эффекторных молекул рецепторного варианта апоптоза в процессе инкубации в условиях «клеточного соседства», ни у здоровых, ни у больных РА. Возможно, полученные резуль-

таты подтверждают данные о том, что большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели.

В культурах пациентов с РА нами было определено значимое подавление антиапоптотического внутриклеточного фактора Bcl-2 относительно контролей в модели «клеточного соседства», в том числе в контрольной пробе «КА» относительно пролиферирующих клеток контроля «К». При этом снижение содержания указанного фактора было наиболее выражено в пробах, содержащих только апоптотические клетки. Длительная инкубация апоптотических клеток, стимулированных антителами к CD3, была сопряжена с полным подавлением Bcl-2 в клеточных лизатах.

Известно, что одними из самых значимых факторов в митохондриальном пути клеточной гибели, является включение регуляторных белков семейства Bcl. Антиапоптотический белок Bcl-2 играет важную роль в клеточной выживаемости [15]. Bcl-2 подавляет апоптоз во многих клеточных системах, включая лимфогематопетические и нейрональные клетки. Регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Ингибирует каспазы за счет предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий и/или за счет связывания фактора, активирующего апоптоз – АРАF1. Известно также, что механизм подавления летальности молекулами Bcl-2 и Bcl-xL, может опосредоваться подавлением аутофагии, а не полным апоптозом [35]. Исследования апоптоза в синовиальной оболочке у пациентов с РА показали, что инфильтрирующие синовию Т-лимфоциты экспрессировали высокий уровень белков семейства Bcl-2 и были резистентны к Fas-опосредованному апоптозу. В то же время известно, что митохондриальный путь апоптоза связан с ответом на цитотоксические стимулы или со снижением ростовых факторов и трофических сигналов, поступающих в клетку в виде цитокинов [10, 35].

Модель совместного культивирования пролиферирующих и апоптотирующих клеток, наиболее близко, по нашему мнению, отражающая события, происходящие в суставах при РА, выявила значительное подавление антиапоптотического внутриклеточного фактора Bcl-2 относительно контролей у пациентов с РА. Между тем, у здоровых людей, клетки, находившиеся в аналогичных условиях, не характеризовались значимой динамикой содержания Bcl-2 в процессе культивирования, но и не имели достоверных различий по содержанию Bcl-2 во всех вариантах культур относительно пациентов с РА. Полученные данные

позволяют сделать предположение о большей чувствительности клеток пациентов к неблагоприятным условиям культивирования, к цитотоксическим стимулам.

Важнейшим фактором, регулирующим клеточную гибель, является белок p53. Этот транскрипционный фактор регулирует репарацию клеточной ДНК, индуцирует апоптоз, отвечает за регуляцию старения и вступления клетки в последующие стадии клеточного цикла, а также участвует в ингибировании ангиогенеза и индукции окислительного шока. Активность белка p53 очень жестко контролируется как аллостерической регуляцией его ДНК-связывающей функции, так и регуляцией стабильности белка в ответ на множество внешних раздражителей, таких как: гипоксия, облучение, высокая концентрация монооксида азота. Транскрипционной мишенью p53 является DR5. Ген p53 активирует гены Bax и Bid, p21, PUMA, происходит образование свободных форм кислорода, что способствует выходу цитохрома-С из митохондрий и запуску апоптоза [18, 21]. Клеточное старение частично регулируется геном TP53, критическим геном-супрессором опухоли, который кодирует 12 или более изоформ белка p53. Изоформы p53 продуцируются посредством инициации в альтернативных сайтах начала транскрипции и трансляции и альтернативного сплайсинга мРНК. Эти белки укороченной изоформы p53 эндогенно экспрессируются в нормальных клетках человека и выполняют важную функциональную роль, включая модуляцию полноразмерного p53-опосредованного клеточного старения, апоптоза и репарации ДНК [3]. Сорокалетний опыт изучения p53 позволил аналитикам обосновать тезис о том, что апоптоз происходит по принципу «все или ничего». Молекулярные взаимодействия и аутоактивация сети p53 сигнальной молекулой стресса АТМ в основной регуляции p53, а также модуль инициации апоптоза с участием Puma, Bcl-2 и Bax определяют решения о судьбах клеток. Роль p53 в качестве апоптотического переключателя может быть нарушена сверхэкспрессией Bcl-2 [3, 7]. Полученные нами результаты свидетельствуют о значимом подавлении не только p53, но и Bcl-2 в апоптотической культуре в процессе инкубации у пациентов с РА и отсутствии достоверных изменений у здоровых людей. В то же время не было выявлено различий по уровню антиапоптотического и проапоптотических факторов между группами доноров и пациентов, что свидетельствует о сходных процессах в клеточном гомеостазе (гибели и пролиферации) в обеих исследуемых группах, по-видимому, в

большей степени выраженных у пациентов с аутоиммунной патологией. Литературные данные свидетельствуют о связи механического напряжения с активностью p53. Известно, что в норме, в условиях полярно-дефицитной конкуренции клеток механическое напряжение активизирует регулятор цитоскелета ROCK, что приводит к повышению активности p53 через активацию p38 [6]. Возможно, скученность клеток в нашей модели апоптоза не послужила достаточным фактором для активации апоптоза у здоровых людей, а у пациентов с РА были задействованы механизмы, повлиявшие на клеточную пролиферацию.

В нашем исследовании инкубация пролиферирующих, апоптотирующих и находящихся в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотирующих клеток у здоровых людей и пациентов с РА сопровождалась повышением продукции IL-6. Известно, что интерлейкин-6 представляет собой многофункциональный белок, который участвует в регуляции иммунного ответа, реакций острой фазы и гематопоеза. Он производится лимфоидными и нелимфоидными клетками, а также нормальными и трансформированными клетками, включая Т-клетки, В-клетки, моноциты, фибробласты, клетки сосудистого эндотелия. Роль IL-6 как про- или противовоспалительного цитокина до сих пор не ясна и во многом зависит от типа сигналинга и многих других причин. В частности, определена антиапоптотическая функция IL-6 в культивируемых β-клетках от стресс-индуцированного апоптоза. Он активирует STAT3, фактор транскрипции, участвующий в аутофагии. IL-6 стимулирует конверсию LC3 и образование аутофагосом [21]. По такому же механизму IL-6 защищает от аномалий нейроны, связанные с депрессией. Повышение уровня IL-6 в области СА1 гиппокампа приводит к плеiotропным защитным действиям, включая снижение оксидативного стресса и модуляцию аутофагии, противовоспалительную активацию и антиапоптотические эффекты [33]. Показано возрастное увеличение IL-6 у стареющих животных, и опосредованное модулированием Vcl-xL и p53 снижение апоптоза [8]. В то же время интерлейкин-6 усиливал TNFα, а TRAIL/Apo2L индуцировал гибель клеток в различных раковых тканях человека, происходящих от злокачественной глиомы, меланомы, рака молочной железы и лейкемии, хотя эффект не был обнаружен при применении только IL-6. IL-6 активировал p53 и рецепторы смерти TRAIL (DR-4 и DR-5) и стимулировал TNFα и TRAIL-зависимый внешний путь апоптоза без активации p53-опосредованного внутреннего пути апоптоза.

Индуцированное TNFα и TRAIL расщепление каспазы-8 и каспазы-3 в большей степени усиливалось IL-6, хотя эти каспазы не расщеплялись только IL-6 [30]. Полученное в нашем исследовании подавление ключевых молекул рецепторного и митохондриального вариантов запуска апоптоза могло послужить тем механизмом, который стимулировал продукцию IL-6 в клеточных культурах и его репаративные функции. Или же усиление продукции в условиях клеточного стресса, которое обуславливает «клеточное соседство» или длительное нахождение клеток в условиях скученности и обеднения культуральной среды, могло переключить цитокин на противовоспалительные и антиапоптотические функции, обеспечивая защитные и репаративные возможности.

Определение уровня IFNγ в супернатантах исследуемых клеточных культур было обусловлено несомненным участием цитокина в ревматоидном воспалении. Известно, что РА представляет собой системное воспалительное заболевание, связанное с повышенным уровнем медиаторов воспаления, включая TNFα, Th17, а также снижением апоптоза воспалительных клеток. Интерферон-γ (IFNγ) вызывает воспалительную реакцию и апоптотическую гибель клеток [20].

Существует много исследований, подтверждающих роль IFNγ в клеточной гибели. В частности, активная передача сигналов IFNγ может непосредственно запускать апоптоз и остановку клеточного цикла в раковых клетках человека. В уже приведенной нами ранее публикации было обнаружено вмешательство IFNγ в аутофагию на этапе слияния аутофагосомы и лизосомы, что нарушало процесс восстановления гомеостаза под влиянием стрессированного эндоплазматического ретикулаума [9]. В то же время отмечается неоднозначность эффекта IFNγ в сложных клеточных системах. Так, в работе [22] было определено, что, с одной стороны, потеря IFNγ способствовала продукции cFLIPL и MLKL и некроптозу, а с другой — дефицит IFNγ увеличивал количество клеток Th17 и повышал экспрессию IL-17 и TNFα. У животных IFNγ -/- CIA в эксперименте наблюдалось усиление повреждения хряща и воспаления суставов. Этот результат позволил авторам сделать вывод, что IFNγ регулирует воспалительную гибель клеток. Эта функциональная пластичность позволяет предположить модулирующее участие IFNγ в гомеостазе.

Однонаправленная стимуляция продукции IL-4 в культурах мононуклеаров, находящихся в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотирующих культур у здоровых людей и пациентов с РА может свидетельствовать

об активации защитных механизмов при культивировании клеток в неблагоприятных условиях. Так, установлено, что нокдаун SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1) увеличивает экспрессию IL-4, в то время как нокдаун IL-4 снижает жизнеспособность клеток и усиливает клеточный апоптоз остеоартритных хондроцитов, трансфицированных миРНК SOCS1. Более того, сниженная экспрессия воспалительных факторов, индуцированная SOCS1, усиливалась при нокдауне IL-4. Заключается, что передача сигналов IL-4 играет решающую роль в регуляторных функциях SOCS1 при апоптозе и воспалении в остеоартритных хондроцитах человека [14]. При изучении механизмов устойчивости к эпителиальному раку было установлено, что IL-4 действует как аутокринный фактор выживания в эпителиальных клетках [32]. При использовании IL-4 в качестве селективного ингибитора роста клеток ОМЛ была выявлена избирательность его действия. Так, воздействие IL-4 вызывало снижение роста и выживаемости первичных клеток пациентов с ОМЛ CD34⁺CD38 из нескольких генетических подтипов ОМЛ, тогда как нормальные стволовые клетки и клетки-предшественники были менее затронуты [27]. Интересные результаты были получены при восстановлении тканей после заражения гельминтами. Было определено, что для репарации тканей недостаточно только IL-4 или IL-13, но IL-4 или IL-13 вместе с апоптозными клетками индуцировали программу восстановления тканей и резидентных макрофагов. Генетическая абляция сенсоров апоптотических клеток нарушала пролиферацию резидентных макрофагов и индукцию генов противовоспалительных и тканевых репараций в легких после заражения гельминтами или в кишечнике после индукции колита [5]. Существует функциональная связь между IL-6 и активностью IL-4 в процессе альтернативной активации противовоспалительных макрофагов. Так, было показано, что активация M2-макрофагов происходит при воздействии IL-4. При этом IL-6 является мощным индуктором экспрессии альфа цепи рецептора IL-4 (IL-4R) в макрофагах, сенсibiliзируя эти клетки к IL-4-опосредованной активации [11, 23].

Проведенные нами ранее исследования свидетельствовали о том, что выраженная в процессе индукции апоптоза экспрессия активационных маркеров на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых людей, в отличие от пациентов с РА, не приводит к запуску процессов пролиферации, в то время как у пациентов значимая экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в процессе индукции апоптоза была ассоциирована с увеличением

числа живых клеток. Различный исход индукции апоптоза в культурах, находящихся в одинаковых условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА позволили нам выдвинуть предположение о различиях в механизмах активации и/или о различных эффекторных молекулах, принимающих участие в автономных и неавтономных эффектах апоптоза у здоровых людей и пациентов с РА.

В данном исследовании был установлен низкий потенциал рецепторного пути активации апоптоза за счет подавления продукции TNF α в процессе инкубации клеток в условиях «клеточного соседства» в культурах здоровых людей и низкого изначально и не меняющегося в динамике и в различных вариантах инкубации уровня TNF α в супернатантах пациентов с РА, а также низкого содержания инициирующей каспазы-8 в обеих группах.

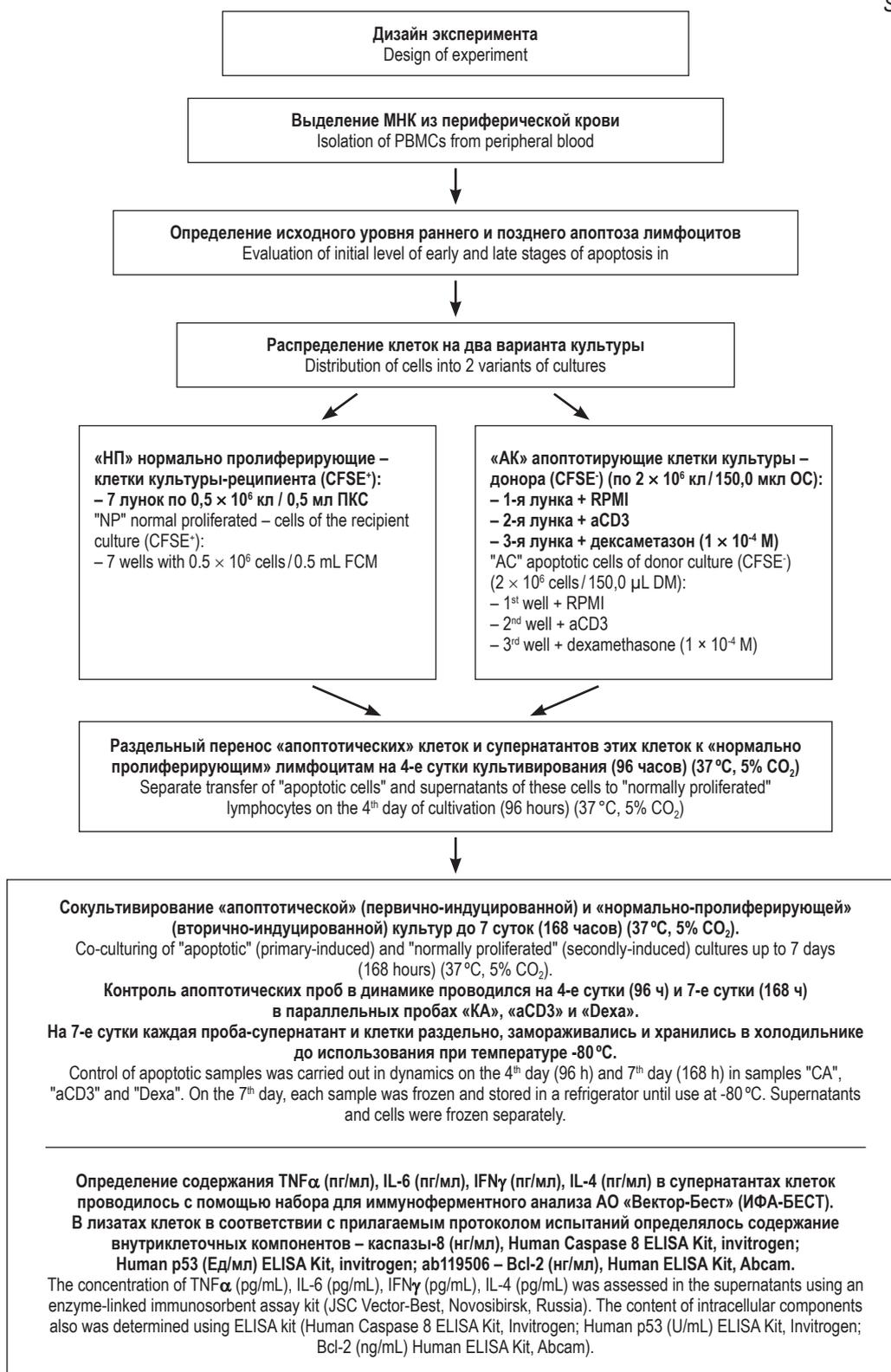
Было определено значимое подавление эффекторных молекул митохондриального пути активации апоптоза — антиапоптотического фактора Bcl-2 и транскрипционного фактора p53 в культурах апоптотических клеток, а также смешанных в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток у пациентов с РА и отсутствие динамики по содержанию указанных белков у здоровых людей. При этом между отдельными вариантами культур пациентов с РА относительно здоровых людей по содержанию указанных молекул различий не было установлено.

Полученные результаты свидетельствовали о разной степени выраженности, но однонаправленных процессах в культурах мононуклеаров, находящихся в неблагоприятных условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотизирующих клеток, как у пациентов с РА, так и у здоровых людей.

Учитывая, что обе исследуемые группы характеризовались значительной активацией продукции IL-4 и IL-6, цитокинов, обладающих автономными и неавтономными защитными и репаративными свойствами, можно заключить, что высокие уровни указанных цитокинов различным образом проявляли себя в культурах клеток, находящихся в условиях «клеточного соседства». Если у здоровых людей нахождение клеток в неблагоприятных условиях сочеталось с поддержанием баланса пролиферации и апоптоза, то у пациентов с РА поддержание указанного баланса активировало процессы пролиферации и сопровождалось увеличением числа живых клеток в апоптотических культурах.

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (РА)
CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)

№ No.	Возраст Age	Диагноз Diagnosis	Длительность Duration of the disease	Лечение Treatment
1	61	РА, серопозитивный, поздняя стадия, эрозивный, Rg III ст., активность умеренная, DAS28 4.68, АЦЦП (+), аМСV (+). ФК II RA, seropositive, late stage, erosive, Rg III stage, moderate activity, DAS28 4.68, aCCP (+), aMCV (+), functional class (FC) II	> 3 лет > 3 years	Метотрексат 15 мг/нед Methotrexate 15 mg/week
2	56	РА, серопозитивный, развернутая стадия, эрозивный, Rg III ст., активность высокая, DAS28 6.2, с системными проявлениями (полинейропатия, анемия). АЦЦП (+). ФК II RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg III stage, high activity, DAS28 6.2, with systemic manifestations (anemia, polyneuropathy). aCCP (+). FC II	> 6 лет > 6 years	Метотрексат 15 мг/нед Methotrexate 15 mg/week
3	59	РА, серопозитивный, развернутая стадия, эрозивный, Rg III ст., активность высокая, DAS28 8.3, с системными проявлениями (плеврит в анамнезе, лихорадка). АЦЦП (+). ФК II. Гормонзависимость RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg III stage, high activity, DAS28 6.2, with systemic manifestations (history of pleurisy, fever). aCCP (+). FC II. Hormone dependent	> 11 лет > 11 years	Метилпреднизолон 500 мг в/в кап № 3, Метотрексат 10 мг/нед, Преднизолон 5 мг – 2 таб. в сутки Methylprednisolone 500 mg intravenous drip No. 3, Methotrexate 10 mg/week, Prednisolone 5 mg 2 tab. per day
4	34	РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность умеренная, DAS28 5.09, с системными проявлениями (синдром Рейно). АЦЦП (+). ФК II RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, moderate activity, DAS28 5.09, with systemic manifestation (Raynaud's syndrome). aCCP (+). FC II	> 8 лет > 8 years	Сульфасалазин 500 мг 3 р/д, Гидроксихлорохин 200 мг 1 р/д Sulfasalazine 500 mg 3 times per day, Hydroxichloroquine 200 mg per day
5	48	РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность средняя, DAS28 4.6. АЦЦП (+). ФК II. Гормонзависимость RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, moderate activity, DAS28 4.6. aCCP (+). FC II. Hormone dependent	> 7 лет > 7 years	Метотрексат 15 мг/нед, Преднизолон 5 мг в сутки Methotrexate 15 mg/week, Prednisolone 5 mg per day
6	56	РА, серонегативный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность высокая, DAS28 5.58. АЦЦП (-). ФК II. Гормонзависимость RA, seronegative, extended stage, not erosive, Rg II stage, high activity, DAS28 5.58. aCCP (-). FC II. Hormone dependent	> 2 лет > 2 years	Метотрексат 20 мг/нед, Преднизолон 5 мг 2 таб. в сутки Methotrexate 20 mg/week, Prednisolone 5 mg 2 tab. per day
7	42	РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность высокая, DAS28 5.2. АЦЦП (+). ФК II RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, , high activity, DAS28 5.2. aCCP (+). FC II	> 9 лет > 9 years	Лефлуноמיד 20 мг в сутки, Преднизолон 5 мг 2 таб. в сутки Leflunomide 20 mg per day, Prednisolone 5 mg 2 tab. per day
8	56	РА, серопозитивный, поздняя стадия, эрозивный, Rg IV ст., активность высокая, DAS28 5.4. АЦЦП (+). ФК II RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg IV stage, high activity, DAS28 5.4. aCCP (+). FC II.	> 22 лет > 22 years	Метотрексат 15 мг/нед Methotrexate 15 mg/week
9	69	РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность высокая, DAS28 5.6, АЦЦП (+), аМСV (+). ФК II RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg II stage, high activity, DAS28 5.6, aCCP (+), aMCV (+). FC II	> 14 лет > 14 years	Метотрексат 15 мг/нед, Сульфасалазин 500 мг 1 р/д Methotrexate 15 mg/week, Sulfasalazine 500 mg per day

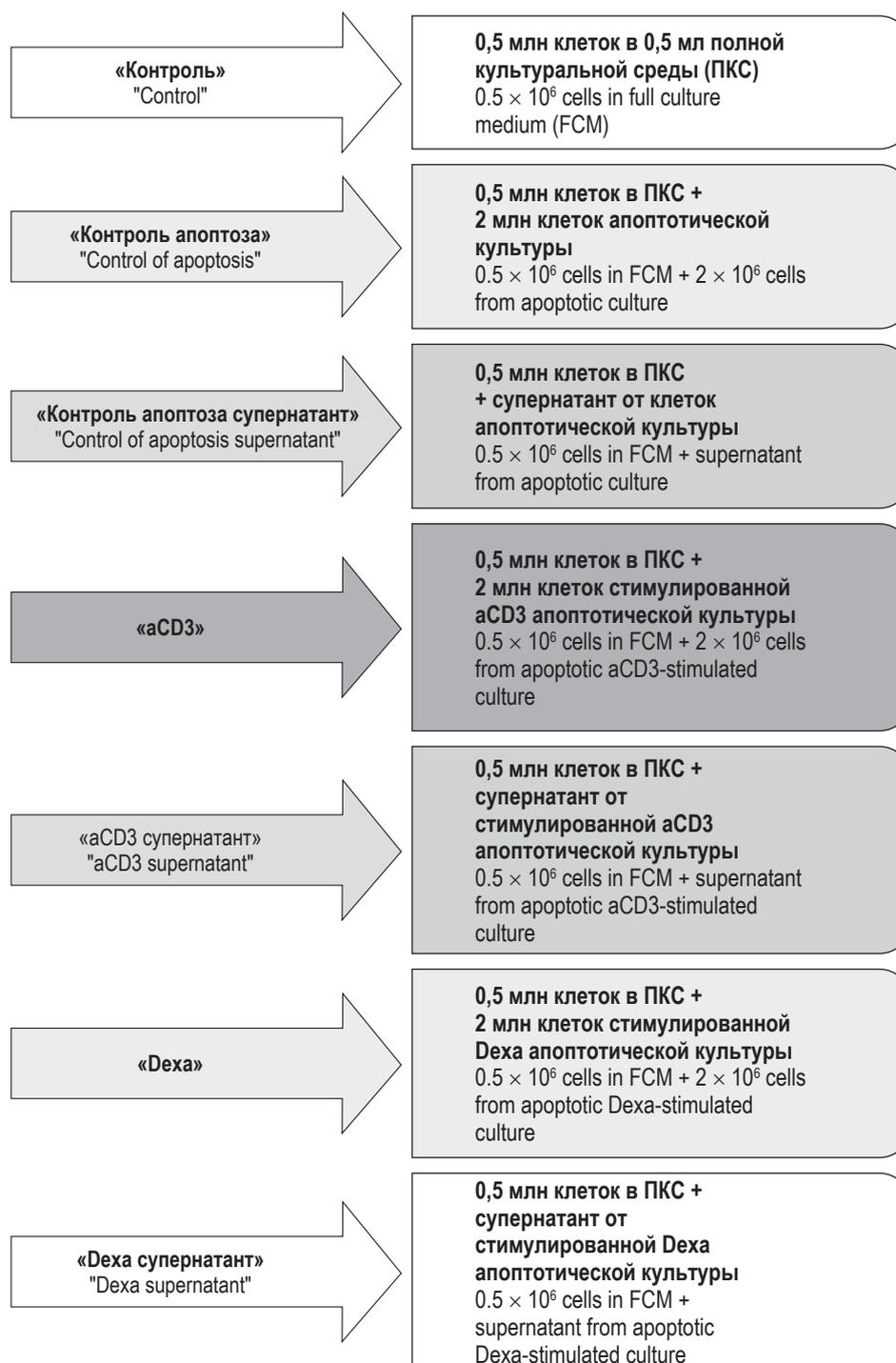


Примечание. «НП» – нормально пролиферирующая культура клеток (CFSE+); «АК» – апоптотическая культура клеток (CFSE-); «ПКС» – полная культуральная среда; «ОС» – обедненная среда; (CFSE-) – клетки культуры-донора; (CFSE+) – клетки культуры-реципиента.

Note. "NP", normally proliferated cell culture (CFSE+); "AC", apoptotic cell culture (CFSE-); "FCM", full culture medium; "DM", depleted culture medium; (CFSE-), cells of the donor-culture; (CFSE+), cells of the recipient-culture.

НОМИНАЛЬНЫЕ НАЗВАНИЯ СОВМЕСТНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОБ КЛЕТОК ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ В ПОЛНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ (НП) И АУТОЛОГИЧНЫХ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (АК)

NOMINAL NAMES OF CO-CULTURED SAMPLES OF CELLS, PROLIFERATED IN A FULL CULTURE MEDIUM (NP), AND AUTOLOGOUS APOPTOTIC CELLS (AC)



Примечание. Объемы переносимых клеток и супернатантов были доведены ПКС до равных объемов – 0,5 мл.

Note. The volumes of transferred cells and supernatants were equalized by FCM to 0.5 mL.

Список литературы / References

1. Арефьева А.С. Роль апоптоза в развитии системных аутоиммунных заболеваний // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 103-107. [Arefyeva A.S. Role of apoptosis in the development of systemic autoimmune diseases. *Immunologiya = Immunologiya*, 2014, Vol. 35, no. 2, pp. 103-107. (In Russ.)]
2. Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания // Клиническая онкогематология, 2014. Т. 7, № 2. С. 103-113. [Kovaleva O.V., Shitova M.S., Zborovskaya I.B. Autophagy: cell death or survival strategy? *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2014, Vol. 7, no. 2, pp. 103-113. (In Russ.)]
3. Beck J., Turnquist C., Horikawa I., Harris C.. Targeting cellular senescence in cancer and aging: roles of p53 and its isoforms. *Carcinogenesis*, 2020, Vol. 41, no. 8, pp. 1017-1029.
4. Bhattacharyya S., Ghosh S.S.. Unfolding transmembrane TNF α dynamics in cancer therapeutics. *Cytokine*, 2021, Vol. 137, 155303. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155303.
5. Bosurgi L., Cao Y.G., Cabeza-Cabrerizo M., Tucci A., Hughes L.D., Kong Y., Weinstein J.S., Licona-Limon P., Schmid E.T., Pelorosso F., Gagliani N., Craft J.E., Flavell R.A., Ghosh S., Rothlin C.V.. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*, 2017, Vol. 356, no. 6342, pp. 1072-1076.
6. Cao Y., Liu J. Impaired apoptosis of peripheral blood CD4⁺T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Chin. J. Cell. Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 31, no. 5, pp. 682-685.
7. Chong K.H., Samarasinghe S., Kulasiri D., Zheng J.. Mathematical modelling of core regulatory mechanism in p53 protein that activates apoptotic switch. *J. Theor. Biol.*, 2019, Vol. 462, pp. 134-147.
8. Cimmino I., Prisco F., Orso S., Agognon A.L., Liguoro P., De Biase D., Doti N., Ruvo M., Paciello O., Beguinot F., Formisano P., Oriente F. Interleukin 6 reduces vascular smooth muscle cell apoptosis via Prep1 and is associated with aging. *FASEB J.*, 2021, Vol. 35, no. 11, e21989. doi: 10.1096/fj.202100943R.
9. Fang C., Weng T., Hu S. Yuan Z., Xiong H., Huang B., Cai Y., Li L., Fu X. IFN- γ -induced ER stress impairs autophagy and triggers apoptosis in lung cancer cells. *Oncoimmunology*, 2021, Vol. 10, no. 1, 1962591. doi: 10.1080/2162402X.2021.1962591.
10. Feng F.B., Qiu H.Y. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 102, pp. 1209-1220.
11. Fernando M.R., Reyes J.L., Iannuzzi J., Leung G., McKay D.M. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 4, e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188
12. Fritsch M., Günther S.D., Schwarzer R., Albert M.C., Schorn F., Werthenbach J.P., Schiffmann L.M., Stair N., Stocks H., Seeger J.M., Lamkanfi M., Krönke M., Pasparakis M., Kashkar H. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 2019, Vol. 575, no. 7784, pp. 683-687.
13. Hashiramoto A., Konishi Y., Murayama K., Kawasaki H., Yoshida K., Tsumiyama K., Tanaka K., Mizuhara M., Shiotsuki T., Kitamura H., Komai K., Kimura T., Yagita H., Shiozawa K., Shiozawa S.. A variant of death-receptor 3 associated with rheumatoid arthritis interferes with apoptosis-induction of T cell. *J. Biol. Chem.*, 2018, Vol. 293, no. 6, pp. 1933-1943.
14. He Q., Sun C., Lei W., Ma J.. SOCS1 Regulates Apoptosis and Inflammation by Inhibiting IL-4 Signaling in IL-1 β -Stimulated Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Biomed. Res. Int.*, 2017, Vol. 2017, 4601959. doi: 10.1155/2017/4601959.
15. Huang Q., Zheng Y., Ou Y., Xiong H., Yang H., Zhang Z., Chen S., Ye Y.. miR-34a/Bcl-2 signaling pathway contributes to age-related hearing loss by modulating hair cell apoptosis. *Neurosci Lett.*, 2017, Vol. 661, pp. 51-56.
16. Hussain A., Tarahomi T., Singh L., Bollampally M., Heydari-Kamjani M., Kesselman M.M. Cardiovascular Risk Associated With TNF Alpha Inhibitor Use in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Cureus*, 2021, Vol. 13, no. 9, e17938. doi: 10.7759/cureus.17938 5.
17. Kawamoto Y, Nakajima YI, Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, 2144. doi: 10.3390/ijms17122144.
18. Kinnaird A., Boukouris A.E., Saleme B., Dromparis P., Zervopoulos S.D., Gurtu V., Sutendra G., Michelakis E.D.. Interaction with p53 explains a pro-proliferative function for VHL in cancer. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2020, Vol. 98, no. 9, pp. 1269-1278.
19. Kong L., Qian K., Wu S., Li B., Guo Z., Yin X., Huang Y., Ye J., Tu X., Fu S.. Functional characterization of TNF- α in pufferfish (*Takifugu obscurus*) in immune response and apoptosis against *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.*, 2021, Vol. 44, no. 9, pp. 1343-1353.
20. Lee S.H., Kwon J.Y., Kim S.Y., Jung K., Cho M.L. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 10133. doi: 10.1038/s41598-017-09767-0.
21. Linnemann A.K., Blumer J., Marasco M.R., Battiola T.J., Umhoefer H.M., Han J.Y., Lamming D.W., Davis D.B. Interleukin 6 protects pancreatic β cells from apoptosis by stimulation of autophagy. *FASEB J.*, 2017, Vol. 31, no. 9, pp. 4140-4152.

22. Mattyasovszky S.G., Mausbach S., Ritz U., Wollstädter J., Schmidtman I., Baranowski A., Drees P., Rommens P.M., Hofmann A. Cytokine Interferon- γ suppresses the function of capsule myofibroblasts and induces cell apoptosis. *J. Orthop. Res.*, 2017, Vol. 35, no. 11, pp. 2524-2533.
23. Mauer J., Denson J.L., Bruning J.C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 2, pp. 92-101.
24. Mirakhor Samani S., Ezazi Bojnordi T., Zarghampour M., Merat S., Fouladi D.F. Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2018, Vol. 38, no. 7, pp. 999-1004.
25. Nakajima Y., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, 2144. doi: 10.3390/ijms17122144.
26. Pegoretti V., Baron W., Laman J.D., Eisel U.L.M. Selective Modulation of TNF-TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 925. doi: 10.3389/fimmu.2018.00925.
27. Peña-Martínez P., Eriksson M., Ramakrishnan R., Chapellier M., Högberg C., Orsmark-Pietras C., Richter J., Andersson A., Fioretos T., Järås M.. Interleukin 4 induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells in a Stat6-dependent manner. *Leukemia*, 2018, Vol. 32, no. 3, pp. 588-596.
28. Pérez-Garijo A, Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*, 2015, Vol. 142, no. 19, pp. 3253-3262.
29. Pérez-Garijo A. When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 82, pp. 86-95.
30. Sano E., Kazaana A., Tadakuma H., Takei T., Yoshimura S., Hanashima Y., Ozawa Y., Yoshino A., Suzuki Y., Ueda T.. Interleukin-6 sensitizes TNF- α and TRAIL/Apo2L dependent cell death through upregulation of death receptors in human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2021, Vol. 1868, no. 7, 119037. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119037.
31. Sestito C., Brevé J.J.P., Bol J.G.J.M., Wilhelmus M.M.M., Drukarch B., van Dam A.M. Tissue Transglutaminase contributes to myelin phagocytosis in interleukin-4-treated human monocyte-derived macrophages. *Cytokine*, Vol. 128, 155024. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155024.
32. Todaro M., Lombardo Y., Francipane M.G., Alea M.P., Cammareri P., Iovino F., di Stefano A.B., di Bernardo C., Agrusa A., Condorelli G., Walczak H., Stassi G.. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ.*, 2008, Vol. 15, no. 4, pp. 762-772.
33. Wang P., Feng Y.B., Wang L., Li Y., Fan C., Song Q., Yu S.Y.. Interleukin-6: Its role and mechanisms in rescuing depression-like behaviors in rat models of depression. *Brain Behav. Immun.*, 2019, Vol. 82, pp. 106-121.
34. Young T.M., Reyes C., Pasnikowski E., Castanaro C., Wong C., Decker C.E., Chiu J., Song H., Wei Y., Bai Y., Zambrowicz B., Thurston G., Daly C. Autophagy protects tumors from T cell-mediated cytotoxicity via inhibition of TNF α -induced apoptosis. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 54, eabb9561. doi: 10.1126/sciimmunol.abb9561.
35. Zhang J., Zhang S., Shi Q., Allen T.D., You F., Yang D.. The anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL suppress Beclin 1/Atg6-mediated lethal autophagy in polyploid cells. *Exp. Cell. Res.*, 2020, Vol. 394, no. 1, 112112. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112112.
36. Zhang K.S., Wang J.F., Zhang S.L., Li Z., Pei Z., Guan Z.P. Effects of tumor necrosis factor alpha on the expression of programmed cell death factor 5 in Arthritis. *Orthop. Surg.*, 2019, Vol. 11, pp. 698-704.
37. Zhang, S., Zhao, J., Ma W. Ma Circ-Sirt1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Autoimmunity*, 2021, Vol. 54, no. 8, pp. 514-525.
38. Zheng L., Wang W., Ni J., Mao X., Song D., Liu T., Wei J., Zhou H. Role of autophagy in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of osteoblast cells. *J. Investig. Med.*, 2017, Vol. 65, no. 6, pp. 1014-1020.

Авторы:

Абрамова Т.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Пашкина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Abramova T.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pashkina E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Гришина Л.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ильина Н.А. — врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий отделением ревматологии, врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный консультант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Grishina L.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ilina N.A., Rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Department of Rheumatology, Rheumatologist, Clinic of immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Advisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.06.2022
Принята к печати 27.06.2022

Received 01.06.2022
Accepted 27.06.2022

ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ФОРМИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ В ГРАНУЛОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Мохаммад А.¹, Филина Ю.В.², Ларионова Р.В.³, Арлеевская М.И.³,
Габдулхакова А.Г.^{2,3}

¹ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»,
г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

² ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан,
Россия

³ Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская
академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань,
Республика Татарстан, Россия

Резюме. Рецепторы формилированных пептидов (FPR) являются важной частью врожденного иммунитета и участвуют в реализации противомикробных функций фагоцитов, таких как хемотаксис, секреторная дегрануляция и респираторный взрыв. Эти ответы фагоцитов реализуются как при остром, так и при системном хроническом воспалении. Избыточное либо постоянное высвобождение провоспалительных лигандов ведет к преактивации фагоцитов, когда последующая стимуляция вызывает более интенсивный клеточный ответ. Связывание рецептора формилированных пептидов агонистом активирует продукцию активных форм кислорода в результате запуска фосфорилирования цитоплазматических субъединиц p47phox и p67phox с последующей их транслокацией к плазматической мембране и сборкой NADPH-оксидазного комплекса. Ревматоидный артрит характеризуется дисбалансом иммунных процессов и аутоиммунной реакцией против тканей суставов. Известно, что при различных патологиях, включая ревматоидный артрит, гранулоциты продуцируют повышенные количества радикалов кислорода. Мы предполагаем, что одним из механизмов такого усиления может быть повышенная экспрессия рецепторов формилированных пептидов или компонентов сигнального пути FPR/РКС/NOX2. Целью настоящего исследования было изучение экспрессии мРНК генов рецепторов формилированных пептидов *fpr1/fpr2* и FPR-зависимой продукции активных форм кислорода изолированными гранулоцитами периферической крови больных ревматоидным артритом.

Объектом исследования были изолированные гранулоциты периферической крови, было проанализировано 166 и 85 образцов пациентов с ревматоидным артритом и здоровых доноров, соответственно. Продукция активных форм кислорода оценивалась с помощью люминол-зависимой

Адрес для переписки:

Габдулхакова Аида Габдрахмановна
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный
университет»
420021, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Парижской Коммуны, 9, комн. 506.
Тел.: 8 (904) 663-72-85.
E-mail: aida.gabdoulkhakova@gmail.com

Address for correspondence:

Aida G. Gabdoulkhakova
Kazan Federal University
420021, Russian Federation, Republic of Tatarstan, Kazan,
Parizhskoi Kommuny str., 9, office 506.
Phone: +7 (904) 663-72-85.
E-mail: aida.gabdoulkhakova@gmail.com

Образец цитирования:

А. Мохаммад, Ю.В. Филина, Р.В. Ларионова,
М.И. Арлеевская, А.Г. Габдулхакова «Экспрессия
и функция рецепторов формилированных пептидов
в гранулоцитах больных ревматоидным артритом»
// Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.
С. 1139-1150. doi: 10.15789/1563-0625-EAF-2503

© Мохаммад А. и соавт., 2022

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A. Mohammad, Yu.V. Filina, R.V. Larionova,
M.I. Arleevskaya, A.G. Gabdulhakova "Expression and
function of receptors for the formylated peptides in granulocytes
of the patients with rheumatoid arthritis", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6,
pp. 1139-1150. doi: 10.15789/1563-0625-EAF-2503

© Mohammad A. et al., 2022

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EAF-2503

хемилюминесценции. Для активации FPR1 использовали формилированный пептид fMLF в концентрации, ответ на который полностью ингибировался при предварительной обработке клеток антагонистом FPR1 N-t-boc-MLF. Активацию FPR2 осуществляли синтетическим пептидом WKYMVM, специфическим агонистом рецептора FPR2. Для больных ревматоидным артритом выявлено повышение уровня спонтанной и вызванной фторболовым эфиром продукции активных форм кислорода изолированными гранулоцитами периферической крови, что отражает преактивированное состояние фагоцитов при ревматоидном артрите. Мы обнаружили, что у пациентов повышена FPR1-опосредованная продукция радикалов кислорода и экспрессия мРНК гена рецептора FPR1 в гранулоцитах крови. Усиление оксидазной функции может быть также связано с конститутивной активацией пути FPR1/ПКС/NOX2 в виду положительной корреляции этих процессов. Продукция активных форм кислорода, вызванная стимуляцией рецептора FPR2, также повышена, однако ее нельзя объяснить гиперэкспрессией мРНК рецептора или активацией ПКС/NOX2, что требует дальнейшего изучения. Установление механизмов регуляции сигнальных каскадов FPR1 и FPR2 может выявить новые мишени для противоревматоидной терапии.

Ключевые слова: формилпептидные рецепторы, ревматоидный артрит, активные формы кислорода, врожденный иммунитет, фагоциты

EXPRESSION AND FUNCTION OF RECEPTORS FOR THE FORMYLATED PEPTIDES IN GRANULOCYTES OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Mohammad A.^a, Filina Yu.V.^b, Larionova R.V.^c, Arleevskaya M.I.^c,
Gabdulhakova A.G.^{b, c}

^a Moscow Physico-Technical Institute, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

^b Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^c Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. Formyl peptide receptors (FPRs) are an important part of innate immunity involved in antimicrobial phagocyte functions such as chemotaxis, secretory degranulation, and respiratory burst. These phagocyte responses are observed in both acute and systemic chronic inflammation. Abundant or constant release of pro-inflammatory ligands leads to the pre-activation of phagocytes when subsequent stimulation induces more intense cellular response. Binding of the formyl peptide receptor with its agonist activates production of reactive oxygen species, due to triggering phosphorylation of the cytoplasmic subunits p47phox and p67phox followed by their translocation to the plasma membrane and assembly into the NADPH oxidase complex. Rheumatoid arthritis is characterized by an imbalance of immune processes and autoimmune responses against the own joint tissues. It is known that, granulocytes produce increased amounts of oxygen radicals in various pathologies, including rheumatoid arthritis. We suggest that such enhancement may be due to increased expression of formyl peptide receptors or components of the FPR/ПКС/NOX2 signaling pathway. Our aim was to study the mRNA expression of *fpr1/fpr2* genes and the FPR-dependent production of reactive oxygen species by isolated peripheral blood granulocytes from the patients with rheumatoid arthritis. Materials and methods. The objects of the study were isolated peripheral blood granulocytes. We analyzed, respectively, 166 and 85 samples from the patients with rheumatoid arthritis and healthy donors. The production of reactive oxygen species was assessed using luminol-dependent chemiluminescence. For FPR1 activation we used a distinct concentration of the formyl peptide fMLF: the response to it was completely inhibited by pretreatment of the cells with FPR1 antagonist N-t-boc-MLF. FPR2 activation was performed by synthetic peptide WKYMVM, a specific receptor agonist. In the patients with rheumatoid arthritis, we have revealed an increased level of spontaneous and phorbol ester-induced production of reactive oxygen species by isolated peripheral blood granulocytes, thus reflecting a pre-activated state of the phagocytes in rheumatoid arthritis. We have found the increased FPR1-mediated production of oxygen radicals and expression of mRNA of *fpr1* gene in blood granulocytes of rheumatoid arthritis patients. Furthermore, the enhancement of oxidase function may be associated with constitutive activation of the FPR1/ПКС/NOX2 pathway as shown by positive correlation between the processes. The production of reactive oxygen species induced by stimulation of the FPR2 receptor is also increased, but it cannot be directly attributed to overexpression of the receptor mRNA or ПКС/NOX2 activation, and requires further study. Understanding the mechanisms of regulation of the FPR1 and FPR2 signaling cascades may reveal new targets for anti-rheumatoid therapy.

Keywords: receptors, formylpeptide, rheumatoid artiritis, reactive oxygen species, innate immunity, phagocytes

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Исследование поддержано грантом РФФИ 19-34-90144.

Введение

В середине 70-х гг. прошлого века было обнаружено, что иммунные клетки экспрессируют специфические поверхностные рецепторы, способные распознавать бактериальные пептиды, содержащие на N-конце формилметионин (fMet) [29]. Эти рецепторы, получившие название «рецепторы формилированных пептидов», относятся к хемотаксическим рецепторам, сцепленным с G-белками (GPCR) [15]. У человека обнаружено три типа рецепторов формилированных пептидов: высокоаффинный FPR/FPR1 с $K_d \sim 1-3$ нМ для синтетического трипептида fMLF, низкоаффинный FPRL1/FPR2 с $K_d \sim 300$ нМ для fMLF, а также FPRL2/FPR3, неспособный связывать митохондриальные и бактериальные формилированные пептиды [7, 13, 14].

FPR экспрессируются преимущественно в фагоцитах [17], но встречаются и в других типах иммунных и неиммунных клеток: FPR1 в костном мозге, легких, желудке и кишечнике, яичках, скелетных и сердечных мышцах, коже, селезенке и лимфоузлах, а также в опухолевых клетках, где они определяют подвижность, рост и ангиогенез; FPR2 экспрессируется клетками различных отделов кишечника, надпочечников, плаценты, костного мозга, ЦНС, щитовидной железы, печени, поджелудочной железы, кожи и селезенки; а FPR3 встречается преимущественно в зрелых моноцитах [5, 13, 34].

Впоследствии было обнаружено, что FPR связывают не только формилированные пептиды, но и другие структурно различные лиганды [13], что определяет широкий спектр ответных реакций клетки. Появляется все больше данных о связи некоторых воспалительных и онкологических заболеваний с экспрессией и функциями FPR или их эндогенных лигандов. Ранее было показано, что FPR, особенно FPR2, участвуют в развитии и прогрессии ревматоидного артрита (РА) [18]. Для синовиальных фибробластов характерен высокий уровень экспрессии FPR2 и его эндогенного агониста, сывороточного амилоида А (SAA) [23]. SAA стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β и IL-6) и матриксных металлопротеиназы-1 и металлопротеиназы-3, что указывает на патологическую роль SAA и FPR2 в развитии ревматоидного артрита: предполагается, что SAA/FPR2 при помощи этих эффекторов опосредуют разрушение ко-

стей и хрящей, что, в конечном итоге, приводит к РА [19]. С другой стороны, сообщается, что активация FPR1/FPR2 агонистом Crpd43 ингибирует экспансию артрогенных эффекторных CD4T-клеток и фибробласт-подобных синовиоцитов, что уменьшает повреждение суставов у мышей с индуцированным артритом [24]. Еще меньше известно о рецепторах формилированных пептидов в гранулоцитах крови больных РА. Наше исследование направлено на исследование экспрессии и функции FPR при ревматоидном артрите, что может стать первым шагом на пути к исследованиям этих рецепторов в качестве мишени для терапии РА.

Материалы и методы

Объект исследования

Образцы крови были получены от женщин, больных РА, в Республике Татарстан в период с 2012 по 2020 год ($n = 166$, медиана возраста 52 года ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$: 38-59)) и здоровых добровольцев ($n = 85$, медиана возраста 30 лет ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$: 24-51)). Критериями включения здоровых лиц в контрольную группу были отсутствие хронического заболевания, в том числе аллергического, отсутствие вируса иммунодефицита человека, случаев РА среди близких родственников. Диагноз РА был установлен на основании критериев ACR/EULAR classification criteria [2]. Исследование одобрено Этическим комитетом КГМА – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (протокол 2/09 от 24.09.2020). Информированное согласие, включая согласие на участие в исследовании и публикацию результатов, было получено от всех испытуемых.

Сбор образцов и выделение клеток

Гранулоциты периферической крови выделяли при помощи центрифугирования на трехслойном градиенте плотности фиколла 1,064/1,077/1,019 г/мл. Клетки суспендировали в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS) без Ca^{2+} и Mg^{2+} в концентрации 10^7 клеток в 1 мл и хранили при 4 °С в течение одного часа до проведения функциональных тестов.

Хемилюминесцентный анализ

Для оценки FPR1/2-опосредованной оксидантной функции НАДФН-зависимую продукцию активных форм кислорода (АФК) с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции на приборе Хемилюм-12 (конструктор Б.Ф. Санталов, ИБК РАН). Регистрацию проводили параллельно в 12 экспериментальных ячейках при 37 °С с перемешиванием [31]. Для каждого измерения использовали 2×10^5 гранулоцитов. Клетки стимулировали тремя стимулами: 1 мкМ форбол-12-ацетат-13-мирилатом (PMA), синтетическими пептидами 0,01 мкМ fMLF и 0,01 мкМ WKYMVM

(Merck, США). Клетки инкубировали при 37 °С в течение 20 минут перед измерением, а затем переносили в хемилюминометр. Каждый стимул добавлялся через 250 с после начала записи. Амплитуда сигнала использовалась для оценки стимулированной продукции АФК.

Клетки обрабатывали 10 мкМ N-t-вос-MLF, антагонистом FPR1, при 37 °С в течение 20 мин перед измерением. Относительную хемилюминесценцию рассчитывали как отношение амплитуды хемилюминесценции в контрольных и обработанных клетках.

ПЦР с обратной транскрипцией

РНК выделяли из 40 образцов суспензии гранулоцитов больных РА и 20 здоровых добровольцев с помощью набора ExtractRNA (ООО «Евроген») согласно инструкции производителя. Количество и качество выделенной РНК измеряли с помощью спектрофотометрии. кДНК синтезировали из 1 мкг тотальной РНК с использованием обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) и случайных гексамерных праймеров в соответствии с протоколом производителя.

ПЦР в реальном времени проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 нг кДНК, с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS-SYBR (ООО «Евроген», Россия) и программы амплификации: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, денатурация при 95 °С 30 с, отжиг при 60 °С 20 с, элонгация при 72 °С 20 с.

Праймеры были разработаны с помощью ПО PrimerBlast [37]:

FPR1 прямой:

5'-CTGAGTCACTCTCCCCAGGA-3';

FPR1 обратный:

5'-CCAGGAAGAGATAGCCAGCA-3';

FPR2 прямой:

5'-GCAGCCTTGAGGTCATAAGC-3';

FPR2 обратный:

5'-TGTAGCCAGCAGACTCATAGG-3';

GAPDH прямой:

5'-CCCATGTTTCGTCATGGGTGT-3';

GAPDH обратный:

5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3'.

Анализ данных

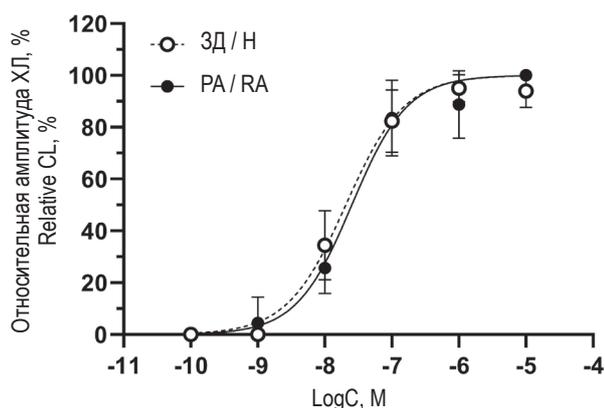
Данные анализировали при помощи Rstudio 3.5.1 и SigmaPlot 12.0. Анализ экспрессии проводили с использованием метода относительной нормализованной экспрессии [21] и пакета rcr R-package [1]. В качестве референса использовали среднее значение экспрессии в контрольной группе. Данные представлены как Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), если не указано иное; значимыми считали различия при p ≤ 0,05.

Результаты

FPR-опосредованная продукция АФК в изолированных гранулоцитах крови

Пептидные агонисты FPR активируют внутриклеточный сигнальный путь, который приводит к разнообразным ответам, включая сборку ферментного комплекса НАДФН (NOX2) и продукцию АФК [16]. В этом исследовании мы использовали люминол-зависимую хемилюминесценцию для анализа продукции АФК, иници-

А (А)



Б (Б)

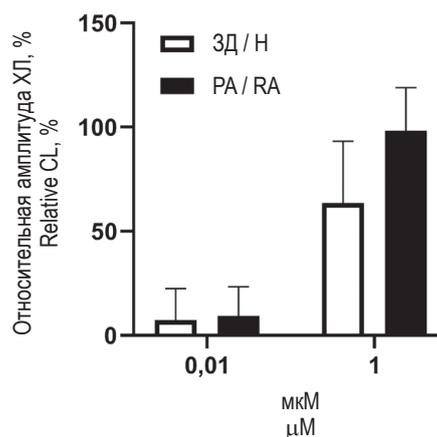


Рисунок 1. fMLF-индуцированная продукция АФК в изолированных гранулоцитах здоровых добровольцев (ЗД) и больных РА (РА): А – дозозависимая активация ответа в гранулоцитах больных РА (n = 7) и контрольной группы (n = 6); Б – относительная амплитуда ответа на 0,01 и 1 мкМ fMLF в клетках, обработанных N-t-вос-MLF

Figure 1. fMLF-induced ROS production in the isolated granulocytes in the groups of healthy donors (HD) and RA patients (RA): (A) dose-dependent activation of the granulocyte response in RA group (n = 7) and control group (n = 7); (B) relative amplitude of the response to 0,01 and 1 μM fMLF in the cells pre-treated by N-t-вос-MLF

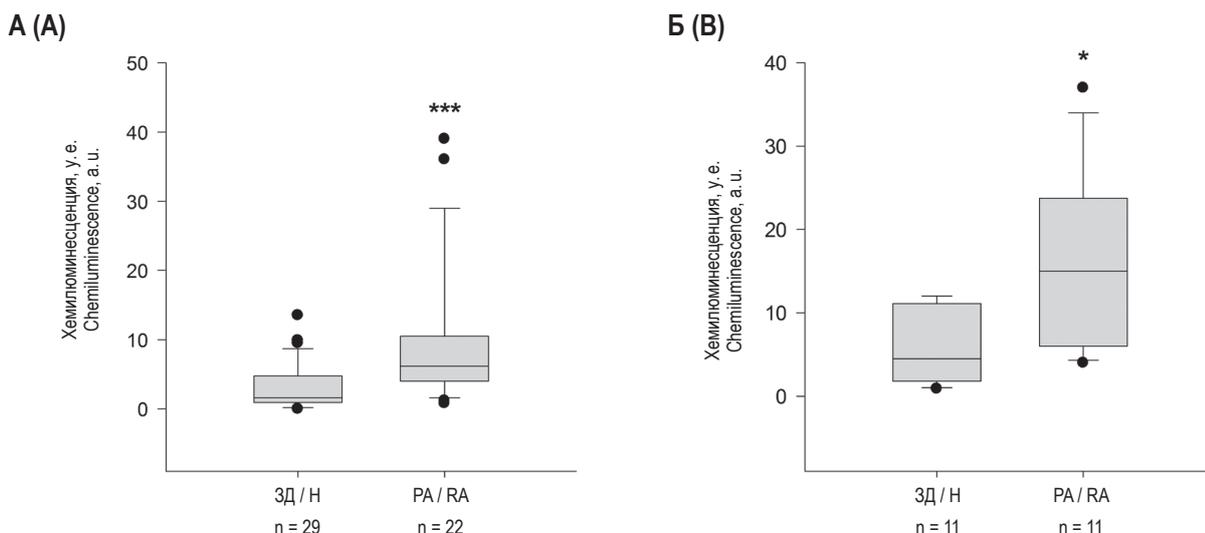


Рисунок 2. Продукция АФК в гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) и больных РА (РА)
Примечание. Представлена амплитуда ответа на 0,01 мкМ fMLF (А) или 0,01 мкМ WKYMVM (Б); * – $p \leq 0,05$, *** – $p \leq 0,001$, U-критерий Манна–Уитни.

Figure 2. ROS production in the peripheral blood granulocytes of healthy donors (HD) and RA patients (RA)
Note. The amplitude of the response to 1 μM fMLF (A) or 0.01 μM WKYMVM is presented; *, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$, Mann–Whitney U test.

ированной через FPR в изолированных гранулоцитах крови.

Для определения EC_{50} при респираторном ответе клетки здоровых добровольцев и больных РА стимулировали fMLF в концентрации 10^{-10} – 10^{-5} М. Выявлено, что EC_{50} составляет $2,051 \times 10^{-8}$ для пациенток с РА и $2,523 \times 10^8$ М для контрольной группы, статистически значимых различий не обнаружено ($p = 0,650$, F-test) (рис. 1А).

Клетки инкубировали с антагонистом FPR1 N-t-вос-MLF (Т-вос) [13] для определения концентрации fMLF, которая вызывает специфический FPR1-опосредованный ответ. Т-вос полностью подавлял продукцию АФК, инициированную fMLF в концентрации 0,01 мкМ и ниже (рис. 1Б).

Таким образом, низкие дозы fMLF (0,01 мкМ и ниже) преимущественно активируют FPR1; при более высоких концентрациях fMLF активирует как FPR1, так и FPR2. В последующих экспериментах для независимой активации FPR1 и FPR2 использовали два разных пептидных лиганда FPR: 0,01 мкМ fMLF и 0,01 мкМ WKYMVM, синтетический пептид, специфичный для FPR2 [13].

Мы обнаружили, что ответы, инициированные через FPR1 и FPR2, были выше у больных РА, по сравнению со здоровыми добровольцами (рис. 2).

Экспрессия FPR1 и FPR2 в гранулоцитах крови

Чтобы проверить, связан ли повышенный респираторный ответ с экспрессией рецептора, мы

проанализировали уровень мРНК FPR1 и FPR2. Используя метод $\Delta\Delta Ct$ с GAPDH в качестве внутреннего контроля, мы обнаружили, что экспрессия FPR1 повышена у пациентов с РА по сравнению со здоровыми добровольцами (0,682 и 1,305 соответственно; $p = 0,044$, U-критерий Манна–Уитни). Достоверных отличий в экспрессии FPR2 у здоровых женщин и больных РА не выявлено (1,191 и 2,322 соответственно; $p = 0,266$, U-критерий Манна–Уитни) (рис. 3).

Спонтанная и РМА-индуцированная продукция АФК

Активность фагоцитарной НАДФН-оксидазы является основным источником образования АФК в гранулоцитах. Интенсивность хемилуминесценции в интактных клетках без каких-либо стимулов использовалась для оценки базальной активности НАДФН-оксидазы. Уровень спонтанной продукции АФК в группе РА был выше по сравнению со здоровыми добровольцами (Ме 0,685 и 1,422, $p = 0,043$, U-критерий Манна–Уитни, рис. 4А).

Гранулоциты стимулировали РМА прямым активатором РКС, чтобы оценить активность сигнального внутриклеточных компонентов передачи сигнала без активации рецептора. Мы обнаружили статистически значимую разницу в ответе на РМА между здоровыми женщинами и больными РА (Ме 12,000 и 15,250, $p = 0,040$, U-критерий Манна–Уитни, рис. 4Б).

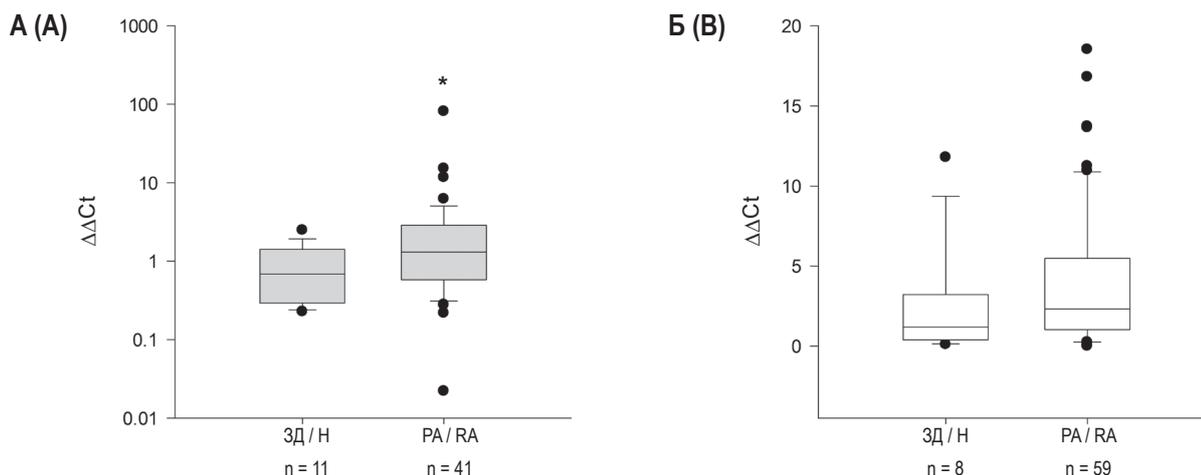


Рисунок 3. Относительная нормализованная экспрессия мРНК FPR1 (А) и FPR2 (Б) у здоровых женщин (ЗД) и больных РА (РА)

Примечание. * – $p \leq 0,05$, U-критерий Манна–Уитни.

Figure 3. Relative normalized expression of mRNA of FPR1 (A) and FPR2 (B) in healthy donors (HD) and RA patients (RA)

Note. *, $p \leq 0.05$; Mann–Whitney U test.

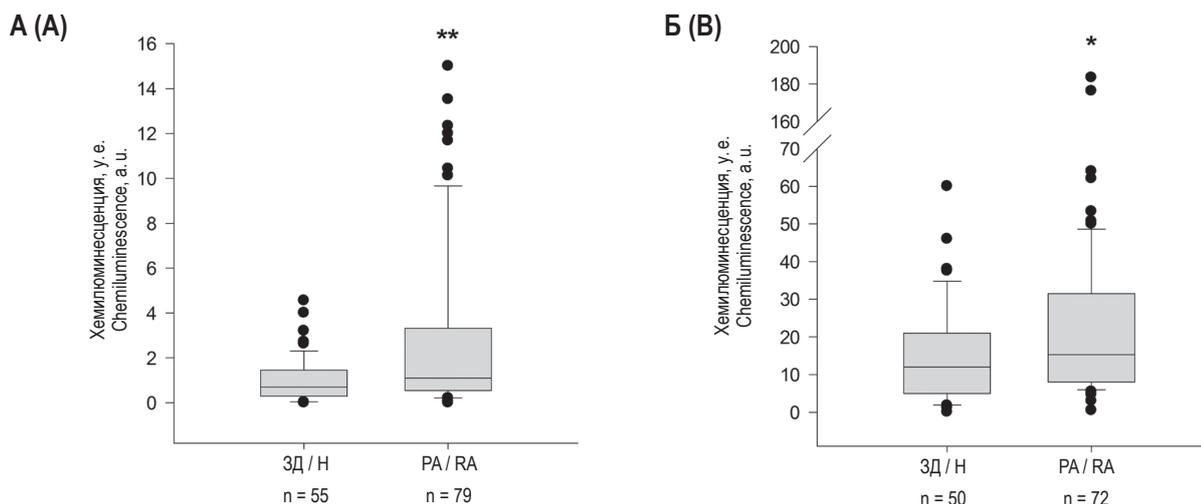


Рисунок 4. Продукция АФК в гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) и больных РА (РА): А – спонтанная генерация АФК (базовый уровень); Б – генерация АФК в ответ на 1 мкРМА

Примечание. Представлена амплитуда ответа; * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, U-критерий Манна–Уитни.

Figure 4. ROS production by the granulocytes of healthy donors (HD) and RA patients (RA): (A) spontaneous generation of ROS (basal level); (B) ROS generation in response to 1 μ M PMA

Note. The amplitude of the response is presented; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; Mann–Whitney U test.

Ранговая корреляция Спирмена использовалась для оценки взаимосвязи между базальной активностью НАДФН-оксидазы и респираторным взрывом, вызванным FPR. Умеренная корреляция была обнаружена между ответом, индуцированным fMLF через FPR1, и спонтанной продукцией АФК у здоровых женщин и пациентов с РА (рис. 5А, В). Достоверной корреляции между ответом, индуцированным WKYMVM (FPR2), и спонтанной продукцией АФК в обеих группах обнаружено не было (рис. 5Б, Г).

Корреляционный анализ был также использован для оценки взаимосвязи между FPR-опосредованной и PMA-индуцированной и продукцией АФК, представляющей вклад РКС-зависимой активации НАДФН-оксидазы в респираторном взрыве гранулоцитов. Умеренная корреляция была обнаружена только между PMA- и WKYMVM-индуцированным ответом в группе здоровых женщин (рис. 6Б), тогда как в остальных случаях корреляции не было (рис. 6А, В, Г).

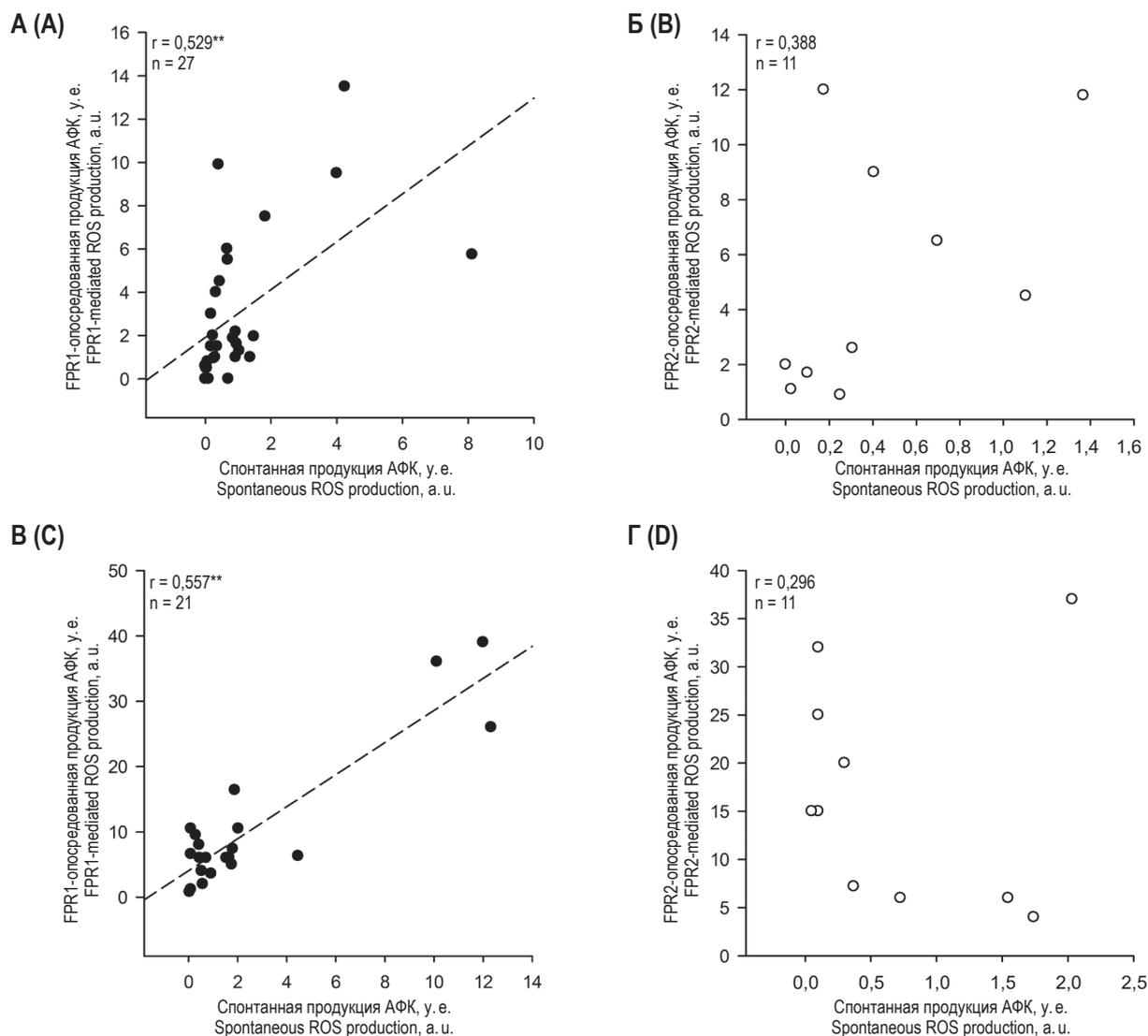


Рисунок 5. Корреляция между спонтанной продукцией АФК и FPR1-опосредованной (правая панель – А, В) или FPR2-опосредованной продукцией АФК (левая панель – Б, Г) в изолированных гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) (верхняя панель – А, Б) и больных РА (РА) (нижняя панель – В, Г)

Примечание. $** - p \leq 0,01$, ранговая корреляция Спирмена.

Figure 5. Correlation between spontaneous ROS generation and FPR1-mediated (right panel – A and C) or FPR2-mediated ROS production (left panel – B and D) in the isolated peripheral blood granulocytes of healthy donors (HD) (upper panel – A and B) and RA patients (RA) (lower panel – C and D)

Note. $** - p \leq 0.01$; Spearman's rank correlation.

Обсуждение

FPR принадлежат к семейству паттерн-распознающих рецепторов, ответственных за связывание формилированных пептидов – продуктов деградации бактериальных и митохондриальных белков [12, 26, 35]. Трансляция белков у прокариот, за исключением архей, инициируется с N-формилметионином, и эта структурная особенность позволяет эукариотическому организму-хозяину распознавать чужеродные белки:

присутствие формилированного метионина является сигналом, указывающим на потенциальную инфекцию. Формилированные пептиды также синтезируются в митохондриях и высвобождаются при повреждении собственных тканей [28].

«Классическая» роль FPR1 связана с хемотаксисом нейтрофилов к очагу инфекции для последующей элиминации микроорганизма при помощи дегрануляции и генерации активных форм кислорода. Однако сейчас известны и другие

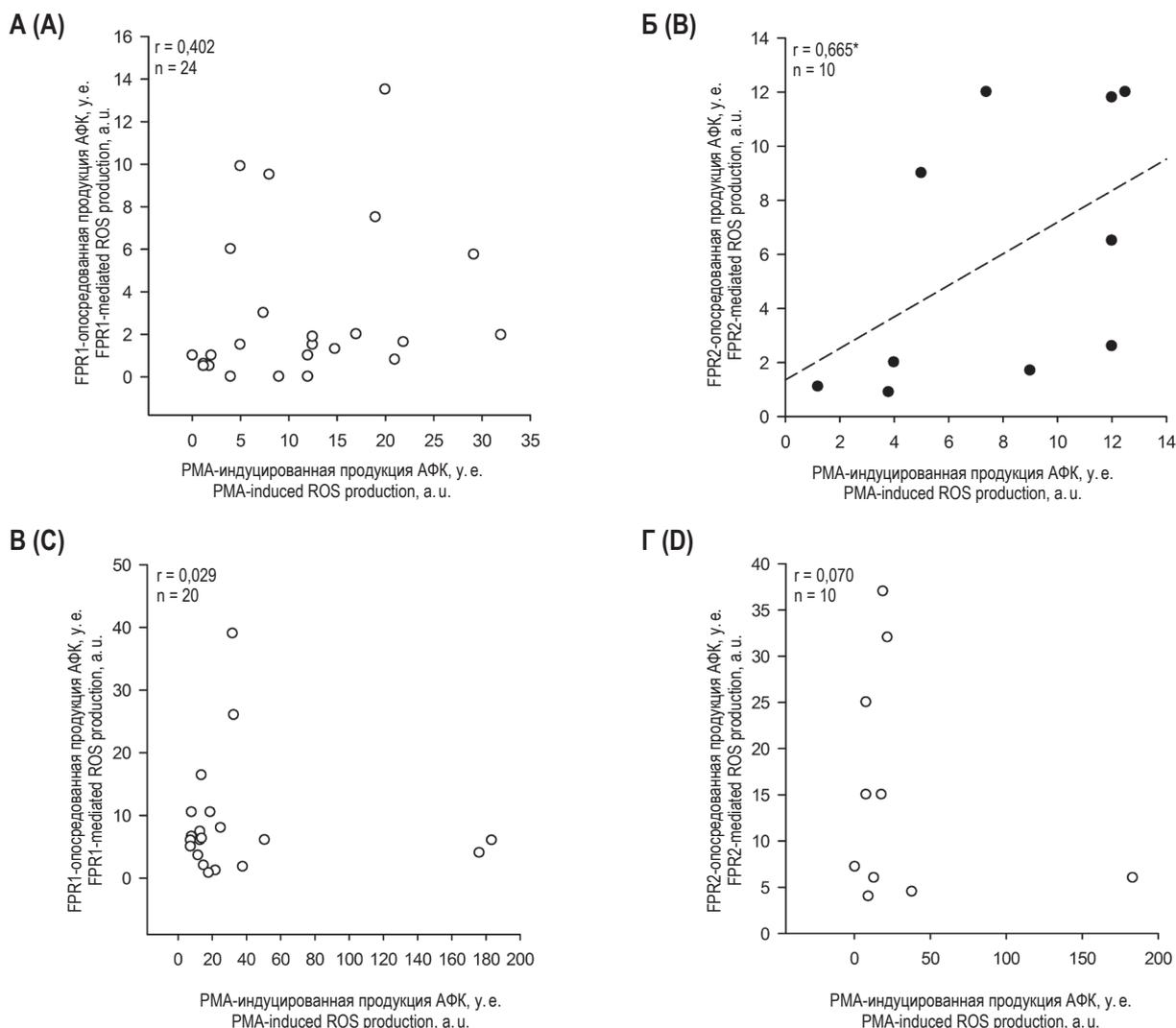


Рисунок 6. Корреляция между PMA-индуцированной и FPR1-опосредованной продукцией АФК (правая панель – А, В) или FPR2-опосредованной продукцией АФК (левая панель – Б, Г) в изолированных гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) (верхняя панель – А, Б) и больных РА (РА) (нижняя панель – В, Г)

Примечание. * – $p \leq 0,05$, ранговая корреляция Спирмена.

Figure 6. Correlation between PMA-induced and FPR1-mediated ROS production (right panel – A and C) or FPR2-mediated ROS production (left panel – C and D) in the isolated peripheral blood granulocytes of healthy donors (HD) (upper panel – A and B) and RA patients (RA) (lower panel – C and D)

Note. *, $p \leq 0.05$; Spearman's rank correlation.

функции FPR1. Например, в изолированных моноцитах человека активация FPR1 усиливает высвобождение IL-8, а также влияет на созревание, миграцию и фенотип дендритных клеток [11]. Также было обнаружено, что fMLF через FPR1 стимулирует активацию тромбоцитов и способствует образованию тромбов в артериях [32]. Недавно Prevet и соавт. обнаружили доказательства защитной роли FPR1 в поддержании целостности эпителия и восстановлении слизистой оболочки после повреждения толстой кишки *in vivo*. Они подтвердили, что формилированные пептиды, высвобождаемые комменсальными бактериями

в толстой кишке, способствуют миграции и пролиферации энтероцитов через FPR1 и НАДФН-оксидазу [27].

FPR2 играет двойную роль во время воспаления. Некоторые лиганды FPR2 запускают воспалительные процессы для устранения инфекции, рекрутирования иммунных клеток и т. д., в то время как другие способствуют инициации противовоспалительных процессов. Эта функциональная двойственность FPR2 изначально определяется природой лигандов. Провоспалительный клеточный ответ активируется бактериальными и митохондриальными формилированными пептидами,

в то время как аннексин А1 (Anx A1) и липоксин А4 (LXA4) индуцируют противовоспалительный ответ [33]. Показано, что переключение между провоспалительными и противовоспалительными клеточными ответами, опосредованными FPR2, связано с конформационными изменениями рецептора при связывании лиганда: связывание противовоспалительных лигандов, таких как Anx A1, вызывает преимущественное образование гомодимеров FPR2/FPR2, что приводит к высвобождению противовоспалительных цитокинов и дифференцировке моноцитов в M2a + M2c-подобные клетки [20]. Воспалительные лиганды, такие как SAA, не вызывают гомодимеризацию рецепторов [8] и могут индуцировать поляризацию макрофагов в подтип M2b или M2d, а также усугубляют инвазию клеток гепатоцеллюлярной карциномы [20].

В соответствии со своей функцией рецепторы формилпептидов играют существенную роль во врожденном иммунитете, отвечая за хемотаксис, дегрануляцию и продукцию АФК. В данной работе мы исследовали возможную роль FPR при ревматоидном артрите, связав рецептор-зависимую продукцию АФК с экспрессией FPR1/FPR2 и РКС-опосредованной активностью НАДФН-оксидазы. Существует несколько возможных взаимосвязей между функцией FPR и развитием и прогрессией РА. Во-первых, это хорошо известная роль FPR в защите хозяина от микробных инфекций, а также увеличение частоты и продолжительности банальных инфекций на ранних стадиях РА [3]. Во-вторых, устойчивая гиперактивированная микробицидная функция может способствовать хроническому воспалению и повреждению тканей.

Мы использовали низкую концентрацию (0,01 мкМ) fMLF для активации FPR1-зависимой продукции АФК и неформилированный синтетический пептид WKYMVM (0,01 мкМ), который преимущественно связывается с FPR2 [13]. Связывание провоспалительных пептидных лигандов активирует внутриклеточный сигнальный путь, который приводит к фосфорилированию субъединиц НАДФН-оксидазы и сборке ферментного комплекса [16], который отвечает за продукцию АФК. В этом исследовании мы использовали продукцию АФК в качестве индикатора функции FPR1 и FPR2 методом люминол-зависимой хемилюминесценции для ее оценки. Мы анализировали амплитуду хемилюминесцентного сигнала в суспензии изолированных гранулоцитов после добавления агонистов fMLF или WKYMVM и обнаружили, что FPR1- и FPR2-

зависимая продукция АФК повышена у пациентов с РА (рис. 2).

Мы предположили, что увеличение продукции FPR-зависимой продукции АФК у пациентов с РА может быть связано с более высоким уровнем экспрессии рецептора, что подтвердилось результатами анализа уровня мРНК FPR1 (рис. 3). Неясно, является ли высокая экспрессия FPR1 врожденной особенностью больных РА или результатом действия внутренних и внешних факторов. На основании данных о более частых и продолжительных инфекциях у больных РА [3], мы считаем более вероятным, что экспрессия FPR1 увеличивается в ответ на присутствие в крови бактериальных лигандов и провоспалительных цитокинов [4].

Циркулирующие нейтрофилы в нормальных гомеостатических условиях находятся в состоянии покоя, но могут переходить в состояние праймирования при воздействии воспалительных агентов, таких как хемокины. Праймирование – приобретение фенотипа «повышенной готовности», обеспечивающего более быструю и агрессивную реакцию на раздражители [30]. Ранее мы показали повышение уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке/плазме у больных РА, что позволяет утверждать наличие праймирующих стимулов в крови больных РА [3].

Фосфорилирование субъединиц НАДФН-оксидазы является сигналом для сборки комплекса и респираторного взрыва, а также основным механизмом праймирования. Классическим регулятором активности NOX2 является серин/треониновая протеинкиназа С, активируемая липидными производными [22, 36]. Мы использовали PMA, синтетический аналог диацилглицерина, для стимуляции РКС и анализа РКС-зависимой активации NOX2 у пациентов с РА. Респираторный взрыв, индуцированный PMA, а также базальный уровень продукции АФК были повышены у больных РА, что свидетельствует об активированном состоянии фагоцитарной НАДФН-оксидазы в гранулоцитах крови больных РА (рис. 4).

Хотя изменения в респираторном взрыве, вызванном FPR1 и PMA, были однонаправленными, т. е. оба ответа были повышены у пациентов с РА, мы не обнаружили какой-либо корреляции между продукцией АФК, индуцированной PMA и 0,01 мкМ fMLF в группе РА (рис. 6). Была обнаружена корреляция между ответами, индуцированными PMA и WKYMVM, в здоровой группе, что свидетельствует о том, что FPR2-зависимая активность в большей степени регулируется вну-

триклеточными, а не внеклеточными факторами. Ответ, вызванный FPR1, коррелировал с базовым уровнем активности НАДФН-оксидазы в обеих группах (рис. 5), что предполагает, что предварительная активация (праймирование) более важна для определения интенсивности ответа, опосредованного FPR1. Стоит отметить, что процесс праймирования респираторного взрыва и активации НАДФН-оксидазы не ограничивается активностью PKC, а также поддерживается p38 MAPK и ERK, ROCK, IRAK-4 и другими киназами [6, 9, 10, 25]. Установление вклада киназных каскадов в передачу сигнала FPR1 и FPR2 может объяснить различия в регуляции функции двух типов рецепторов FPR при ревматоидном артрите и определить новые терапевтические мишени.

Заключение

Мы исследовали экспрессию и функцию рецепторов формилированных пептидов в гранулоцитах больных ревматоидным артритом, поскольку эти два рецептора выполняют регуляторную функцию при воспалительных процессах. Повышение уровня спонтанной и индуцированной РМА продукции АФК отражает преактивированное состояние НАДФН-оксидазы в гра-

нулоцитах больных РА. Вместе с более высокой экспрессией FPR1 и повышенным респираторным ответом на агонист FPR1 эти данные позволяют предположить активацию сигнального пути FPR1/PKC/NOX2 в гранулоцитах больных РА. Из-за большего разнообразия сигнальных путей и лигандов FPR2, его вклад в воспаление не столь однозначен и требует дальнейшего изучения. Установление механизмов регуляции сигнальных каскадов FPR1 и FPR2 может выявить новые мишени для противоревматоидной терапии.

Вклад авторов

АМ и ЮВФ внесли равнозначный вклад в эту работу. АМ, АГГ, ЮВФ и МИА: инициация и разработка методологии исследования; МИА: клинические осмотры и отбор участников исследования; АМ, ЮВФ, АГГ, РВЛ: экспериментальная работа; анализ данных – все авторы; АМ: проект рукописи; АГГ, ЮВФ и МИА: финальная коррекция.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии» Казанского федерального университета за техническую и научную поддержку.

Список литературы / References

1. Ahmed M., Kim D.R. pcr: an R package for quality assessment, analysis and testing of qPCR data. *PeerJ*, 2018, Vol. 6, e4473. doi: 10.7717/peerj.4473.
2. Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham C.O., 3rd, Birnbaum N.S., Burmester G.R., Bykerk V.P., Cohen M.D., Combe B., Costenbader K.H., Dougados M., Emery P., Ferraccioli G., Hazes J.M., Hobbs K., Huizinga T.W.J., Kavanaugh A., Kay J., Kvien T.K., Laing T., Mease P., Menard H.A., Moreland L.W., Naden R.L., Pincus T., Smolen J.S., Stanislawski-Biernat E., Symmons D., Tak P. P., Upchurch K.S., Vencovsky J., Wolfe F., Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 9, pp. 2569-2581.
3. Arleevskaya M. I., Gabdoulkhakova A.G., Filina Y.V., Miftakhova R.R., Bredberg A., Tsybulkin A.P. A transient peak of infections during onset of rheumatoid arthritis: a 10-year prospective cohort study. *BMJ Open*, 2014, Vol. 4, no. 8, e005254. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005254.
4. Arleevskaya M.I., Shafigullina A.Z., Filina Y.V., Lemerle J., Renaudineau Y. Associations between viral infection history symptoms, granulocyte reactive oxygen species activity, and active rheumatoid arthritis disease in untreated women at onset: results from a longitudinal cohort study of Tatarstan women. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1725. doi: 10.3389/fimmu.2017.01725.
5. Arterburn J.B., Oprea T.I., Prossnitz E.R., Edwards B.S., Sklar L.A. Discovery of selective probes and antagonists for G-protein-coupled receptors FPR/FPRL1 and GPR30. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2009, Vol. 9, no. 13, pp. 1227-1236.
6. Cap K.C., Kim J.G., Hamza A., Park J.B. P-Tyr42 RhoA GTPase amplifies superoxide formation through p47phox, phosphorylated by ROCK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2020, Vol. 523, no. 4, pp. 972-978.
7. Chen K., Le Y., Liu Y., Gong W., Ying G., Huang J., Yoshimura T., Tessarollo L., Wang J.M. A critical role for the G protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 7, pp. 3331-3335.
8. Cooray S.N., Gobetti T., Montero-Melendez T., McArthur S., Thompson D., Clark A.J., Flower R.J., Perretti M. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2013, Vol. 110, no. 45, pp. 18232-18237.

9. Dang P.M., Stensballe A., Boussetta T., Raad H., Dewas C., Kroviarski Y., Hayem G., Jensen O.N., Gougerot-Pocidalo M.A., El-Benna J. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 7, pp. 2033-2043.
10. Dewas C., Dang P.M., Gougerot-Pocidalo M.A., El-Benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 8, pp. 4392-4398.
11. Dorward D.A., Lucas C.D., Chapman G.B., Haslett C., Dhaliwal K., Rossi A.G. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *Am. J. Pathol.*, 2015, Vol. 185, no. 5, pp. 1172-1184.
12. Fu H., Bjorkman L., Janmey P., Karlsson A., Karlsson J., Movitz C., Dahlgren C. The two neutrophil members of the formylpeptide receptor family activate the NADPH-oxidase through signals that differ in sensitivity to a gelsolin derived phosphoinositide-binding peptide. *BMC Cell Biol.*, 2004, Vol. 5, no. 1, 50. doi: 10.1186/1471-2121-5-50.
13. He H.Q., Troksa E.L., Caltabiano G., Pardo L., Ye R.D. Structural determinants for the interaction of formyl peptide receptor 2 with peptide ligands. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 4, pp. 2295-2306.
14. He H.Q., Ye R.D. The formyl peptide receptors: diversity of ligands and mechanism for recognition. *Molecules*, 2017, Vol. 22, no. 3, 455. doi: 10.3390/molecules22030455.
15. Jazayeri A., Dias J.M., Marshall F.H. From G protein-coupled receptor structure resolution to rational drug design. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 32, pp. 19489-19495.
16. Karimi G., Houee Levin C., Dagher M.C., Baciou L., Bizouarn T. Assembly of phagocyte NADPH oxidase: A concerted binding process? *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, Vol. 1840, no. 11, pp. 3277-3283.
17. Le Y., Oppenheim J.J., Wang J.M. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001, Vol. 12, no. 1, pp. 91-105.
18. Lee H.Y., Lee M., Bae Y.S. Formyl peptide receptors in cellular differentiation and inflammatory diseases. *J. Cell. Biochem.*, 2017, Vol. 118, no. 6, pp. 1300-1307.
19. Lee M.-S., Yoo S.-A., Cho C.-S., Suh P.-G., Kim W.-U., Ryu S.H. Serum amyloid A binding to formyl peptide receptor-like 1 induces synovial hyperplasia and angiogenesis. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 8, pp. 5585-5594.
20. Li Y., Cai L., Wang H., Wu P., Gu W., Chen Y., Hao H., Tang K., Yi P., Liu M. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*, 2011, Vol. 30, no. 36, pp. 3887-3899.
21. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, Vol. 25, no. 4, pp. 402-408.
22. Nauseef W.M., Volpp B.D., McCormick S., Leidal K.G., Clark R.A. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J. Biol. Chem.*, 1991, Vol. 266, no. 9, pp. 5911-5917.
23. Odobasic D., Jia Y., Kao W., Fan H., Wei X., Gu R., Ngo D., Kitching A.R., Holdsworth S.R., Morand E.F. Formyl peptide receptor activation inhibits the expansion of effector T cells and synovial fibroblasts and attenuates joint injury in models of rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, Vol. 61, pp. 140-149.
24. O'Hara R., Murphy E.P., Whitehead A.S., FitzGerald O., Bresnihan B. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 6, pp. 1788-1799.
25. Pacquelet S., Johnson J.L., Ellis B.A., Brzezinska A.A., Lane W.S., Munafo D.B., Catz S.D. Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochem. J.*, 2007, Vol. 403, no. 3, pp. 451-461.
26. Panaro M.A., Acquafredda A., Sisto M., Lisi S., Maffione A.B., Mitolo V. Biological role of the N-formyl peptide receptors. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2006, Vol. 28, no. 1, pp. 103-127.
27. Prevece N., Liotti F., Marone G., Melillo R.M., de Paulis A. Formyl peptide receptors at the interface of inflammation, angiogenesis and tumor growth. *Pharmacol. Res.*, 2015, Vol. 102, pp. 184-191.
28. Raabe C.A., Groper J., Rescher U. Biased perspectives on formyl peptide receptors. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2019, Vol. 1866, no. 2, pp. 305-316.
29. Richard D.Y., Boulay F., Wang J.M., Dahlgren C., Gerard C., Parmentier M., Serhan C.N., Murphy P.M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol. Rev.*, 2009, Vol. 61, no. 2, pp. 119-161.
30. Safronova V.G., Gabdoulkhakova A.G., Miller A.V., Kosarev I.V., Vasilenko R. N. Variations of the effect of insulin on neutrophil respiratory burst. The role of tyrosine kinases and phosphatases. *Biochemistry (Mosc.)*, 2001, Vol. 66, no. 8, pp. 840-849.

31. Safronova V.G., Gabdoulkhakova A.G., Santalov B.F. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, 2002, Vol. 23, no. 8, pp. 599-606.
32. Salamah M.F., Ravishankar D., Vaiyapuri R., Moraes L.A., Patel K., Perretti M., Gibbins J.M., Vaiyapuri S. The formyl peptide fMLF primes platelet activation and augments thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.*, 2019, Vol. 17, no. 7, pp. 1120-1133
33. Stama M.L., Ślusarczyk J., Lacivita E., Kirpotina L.N., Schepetkin I.A., Chamera K., Riganti C., Perrone R., Quinn M.T., Basta-Kaim A. Novel ureidopropanamide based N-formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists with potential application for central nervous system disorders characterized by neuroinflammation. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, Vol. 141, pp. 703-720.
34. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjostedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Ponten F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 2015, Vol. 347, no. 6220, 1260419. doi: 10.1126/science.1260419.
35. Wittmann S., Frohlich D., Daniels S. Characterization of the human fMLP receptor in neutrophils and in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 2002, Vol. 135, no. 6, pp. 1375-1382.
36. Xia N., Tenzer S., Lunov O., Karl M., Simmet T., Daiber A., Munzel T., Reifenberg G., Forstermann U., Li H. Regulation of NADPH Oxidase-Mediated Superoxide Production by Acetylation and Deacetylation. *Front. Physiol.*, 2021, Vol. 12, 693702. doi: 10.3389/fphys.2021.693702.
37. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 2012, Vol. 13, 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

Авторы:

Мохаммад Аффра – аспирант лаборатории геномной инженерии ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

Филина Ю.В. – научный сотрудник OpenLab «Генные и клеточные технологии» ИФМиБ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Ларионова Р.В. – научный сотрудник Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Арлеевская М.И. – к.м.н., старший научный сотрудник Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Габдулхакова А.Г. – к.б.н., старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; старший научный сотрудник Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Mohammad Afraa, Postgraduate Student, Laboratory of Genomic Engineering, Moscow Physico-Technical Institute, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

Filina Yu.V., Research Associate, Open Laboratory of Gene and Cell Technologies, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Larionova R.V., Research Associate, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Arleevskaya M.I., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Gabdulhakova A.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Kazan Federal University; Senior Research Associate, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 12.04.2022
Отправлена на доработку 22.05.2022
Принята к печати 27.05.2022

Received 12.04.2022
Revision received 22.05.2022
Accepted 27.05.2022

ЭКСПРЕССИЯ M2-АССОЦИИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ В СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ У ФЕРТИЛЬНЫХ НЕБЕРЕМЕННЫХ И БЕРЕМЕННЫХ С НЕОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТАЦИЕЙ

Шевела Е.Я.¹, Бухтуева Н.Г.², Тихонова М.А.¹, Леплина О.Ю.¹,
Пасман Н.М.³, Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ГБУЗ НСО «Городская больница № 1», г. Новосибирск, Россия

³ Институт медицины и психологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Циркулирующие моноциты включают у человека классические (CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические/альтернативные (CD14⁺CD16⁺⁺) моноциты, которые, в свою очередь, могут активироваться по классическому или альтернативному пути. Беременность сопровождается существенными изменениями в компартменте моноцитов, что проявляется повышением количества циркулирующих моноцитов, в том числе доли промежуточных моноцитов, и изменением их функции. Однако функциональные свойства субпопуляций моноцитов при гестации остаются во многом неисследованными. Мы предположили, что циркулирующие моноциты могут активироваться по альтернативному типу и приобретать признаки M2-поляризации (противовоспалительные/иммуносупрессивные свойства). Целью работы явилось исследование M2-ассоциированных маркеров, характеризующих противовоспалительный и иммуносупрессивный потенциал миелоидных клеток, в субпопуляциях циркулирующих моноцитов у фертильных небеременных и женщин с неосложненной гестацией во втором триместре. Показано, что у фертильных небеременных женщин промежуточные и неклассические моноциты характеризуются более высокой экспрессией M2-ассоциированных маркеров (CD206, Arginase 1, MerTK) по сравнению с классическими моноцитами. Во втором триместре беременности экспрессия указанных молекул на моноцитах статистически значимо возрастает, что проявляется: 1) возрастанием доли CD206⁺ клеток в субпопуляциях классических и промежуточных моноцитов, 2) увеличением средней интенсивности флуоресценции Arginase 1 во всех субпопуляциях моноцитов, 3) повышением доли MerTK⁺ клеток в субпопуляциях классических и промежуточных моноцитов и средней интенсивности флуоресценции во всех субпопуляциях моноцитов. При этом наибольшее содержание CD206⁺ и MerTK⁺ клеток у беременных выявляется в субпо-

Адрес для переписки:

Шевела Екатерина Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Ekaterina Ya. Shevela
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: +7 (383) 228-21-01.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Я. Шевела, Н.Г. Бухтуева, М.А. Тихонова,
О.Ю. Леплина, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных «Экспрессия
M2-ассоциированных молекул в субпопуляциях
циркулирующих моноцитов у фертильных небеременных
и беременных с неосложненной гестацией»
// Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.
С. 1151-1158. doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2524

© Шевела Е.Я. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E. Ya. Shevela, N. G. Bukhtueva, M. A. Tikhonova,
O. Yu. Leplina, N. M. Pasman, E. R. Chernykh "Expression
of M2-associated molecules in circulating monocyte subsets
in fertile non-pregnant women and pregnant women with
uncomplicated pregnancy", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6,
pp. 1151-1158. doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2524

© Shevela E. Ya. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2524

пуляции промежуточных моноцитов, а наиболее высокие показатели средней интенсивности флюоресценции Arginase 1 и MerTK – в субпопуляциях промежуточных и неклассических моноцитов. Полученные данные демонстрируют, что моноциты беременных во втором триместре беременности характеризуются признаками M2-поляризации. Это подтверждается не только усилением экспрессии M2-ассоциированного маннозного рецептора CD206, но и усилением экспрессии Arginase 1 и MerTK, опосредующих иммуносупрессивную активность миелоидных клеток и, в частности, макрофагов M2-фенотипа. Дальнейшие исследования M2-ассоциированных маркеров в субпопуляциях моноцитов в динамике гестации позволят более детально охарактеризовать регуляторную роль циркулирующих миелоидных клеток при беременности.

Ключевые слова: субпопуляции моноцитов, M2-поляризация, беременность, маннозный рецептор, аргиназа-1, тирозинкиназа Mer

EXPRESSION OF M2-ASSOCIATED MOLECULES IN CIRCULATING MONOCYTE SUBSETS IN FERTILE NON-PREGNANT WOMEN AND PREGNANT WOMEN WITH UNCOMPLICATED PREGNANCY

Shevela E.Ya.^a, Bukhtueva N.G.^b, Tikhonova M.A.^a, Leplina O.Yu.^a,
Pasman N.M.^c, Chernykh E.R.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b City Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

^c Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. In humans circulating monocytes include classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺) and non-classical/alternative (CD14⁺CD16⁺⁺) monocytes, which in turn can be activated via the classical or alternative pathway. Pregnancy is accompanied by significant changes in the monocyte compartment, which is manifested by an increase in the number of circulating monocytes, including the proportion of intermediate monocytes, and a change in their function. However, the functional properties of monocyte subsets during gestation remain largely unexplored. We hypothesized that circulating monocytes may be activated in an alternative pattern and acquire features of M2 polarization (anti-inflammatory / immunosuppressive properties). The aim of the investigation was to study M2-associated markers that characterize the anti-inflammatory and immunosuppressive potential of myeloid cells in subpopulations of circulating monocytes in fertile non-pregnant women and women with uncomplicated pregnancy in the 2nd trimester. It was shown that in fertile non-pregnant women intermediate and non-classical monocytes are characterized by a higher expression of M2-associated markers (CD206, Arginase 1, MerTK) compared to classical monocytes. In the 2nd trimester of pregnancy, the expression of these molecules on monocytes increases significantly, which is manifested by 1) an increase in the proportion of CD206⁺ cells in subpopulations of classical and intermediate monocytes, 2) an increase in the mean fluorescence intensity of Arginase 1 in all monocyte subsets, 3) an increase in the proportion of MerTK⁺ cells in subpopulations of classical and intermediate monocytes and mean fluorescence intensity across all monocyte subsets. The highest content of CD206⁺ and MerTK⁺ cells in pregnant women is detected in the subpopulation of intermediate monocytes, and the highest values of the mean fluorescence intensity of Arginase 1 and MerTK – in the subpopulations of intermediate and non-classical monocytes. The data obtained demonstrate that monocytes of pregnant women in the 2nd trimester of pregnancy are characterized by signs of M2 polarization. This is confirmed not only by an increase in the expression of the M2-associated mannose receptor CD206, but also by an increase in the expression of Arginase 1 and MerTK, which mediate the immunosuppressive activity of myeloid cells and, in particular, macrophages of the M2 phenotype. Further studies of M2-associated markers in monocyte subpopulations during gestation will allow a more detailed characterization of the regulatory role of circulating myeloid cells during pregnancy.

Keywords: monocyte subsets, M2 polarization, pregnancy, mannose receptor, arginase 1, Mer tyrosine kinase

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (№ гос. регистрации в ЕГИСУ НИОКТР 122011800324-4).

Введение

Моноциты являются высоко пластичной популяцией клеток врожденного иммунитета, которые представлены в кровотоке гетерогенной популяцией и включают у человека классические (CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические/альтернативные (CD14⁺CD16⁺⁺) моноциты [18]. Эти субпопуляции отражают последовательные стадии дифференцировки моноцитов, которые характеризуются различными функциями и ассоциацией с патологиями [5]. При этом данные о функциональной активности различных субпопуляций моноцитов при патологии крайне противоречивы [5], что может объясняться особенностями активации этих клеток. Подобно макрофагам, моноциты могут приобретать оппозитные функции в зависимости от активации клеток по классическому или альтернативному пути. Классически активированные моноциты (M1 моноциты) продуцируют провоспалительные цитокины и активируют Th1-ответ, тогда как альтернативно активированные моноциты продуцируют противовоспалительные цитокины (в том числе IL-10) и индуцируют Th2-ответ [9, 10].

Беременность сопровождается существенными изменениями в компартменте моноцитов, что проявляется возрастанием доли циркулирующих моноцитов, усилением экспрессии маркеров активации (CD11b, CD64) и продукции свободных радикалов кислорода и одновременным снижением ЛПС-стимулированной секреции цитокинов [8, 15]. При этом изменения в субпопуляционной структуре моноцитов манифестируют возрастанием доли промежуточных моноцитов [17]. Однако функциональные свойства этих клеток, а также других субпопуляций моноцитов, при гестации остаются во многом неисследованными.

Учитывая доминирование активности Th2-клеток на протяжении большего срока гестации, мы предположили, что циркулирующие моноциты могут активироваться по альтернативному типу и приобретать признаки M2-поляризации (противовоспалительные/иммуносупрессивные свойства). При этом усиление экспрессии M2-ассоциированных молекул, в том числе опосредующих супрессорный потенциал миелоидных клеток, может свидетельствовать об эф-

фективности перестройки иммунной системы при беременности. Известно, что одной из M2-ассоциированных молекул является маннозный рецептор CD206 [9]. В отношении молекул, опосредующих супрессорную функцию миелоидных клеток, особое внимание привлекают два фермента – аргиназа-1 (Arginase 1, Arg1) и мертирозинкиназа Mer (MerTK). Недостаточность аргинина вследствие его расщепления аргиназой оказывает ингибирующий эффект на T-клетки, а продукты метаболизма аргинина (орнитин, полиамины, пролин) необходимы для обеспечения пролиферации различных клеток [13]. MerTK на поверхности макрофагов является рецептором эффероцитоза и активирует сигнальный путь, приводящий к образованию липоксинов и резолвинов, которые подавляют иммунный ответ (усиливают дифференцировку моноцитов в макрофаги M2-фенотипа, смещают баланс Th17/Treg в сторону Treg) [4]. Кроме того, сигналинг через MerTK приводит к подавлению активности NF-κB и снижению LPS-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов/хемокинов, а также возрастанию продукции IL-10, TGF-β и HGF, что способствует усилению супрессорных и прорепаративных эффектов макрофагов [6]. Однако у человека сведения об экспрессии Arg1 и MerTK в субпопуляциях моноцитов и их изменениях при беременности отсутствуют.

Исходя из вышесказанного, **целью настоящего исследования** явилось изучение экспрессии M2-ассоциированных маркеров, характеризующих противовоспалительный и иммуносупрессивный потенциал миелоидных клеток, в субпопуляциях циркулирующих моноцитов у фертильных небеременных и женщин с неосложненной гестацией.

Материалы и методы

Настоящее исследование проводили в рамках фундаментальных научных исследований. За период с сентября 2021 г. по февраль 2022 г. в исследование были рекрутированы 20 беременных на сроке гестации от 17 до 23 недель, в возрасте от 17 до 39 лет. Среди них первая беременность имела место у 11 (55%) женщин, высокий паритет родов (3 и 7) отмечался только у 2 (10%) женщин. В подавляющем большинстве (95%) случаев беременность наступила в естественном цикле и только в одном – с использованием методов вспомогательных репродуктивных технологий. Анализ соматического анамнеза не выявил значительных заболеваний: у 6 женщин отмечалось снижение функции щитовидной железы, что эндемически

характерно для Новосибирской области. Беременности в исследуемой группе протекали без осложнений, средняя прибавка массы тела составила 2,5 кг. На малом сроке беременности пять беременных перенесли ОРВИ, а две – подтвержденную лабораторно новую коронавирусную инфекцию. Вирусные заболевания протекали в легкой форме, и госпитализация в инфекционный стационар не требовалась. Группу сравнения составили 11 здоровых женщин без отягощенного соматического анамнеза с нормальной массой тела (ИМТ от 18 до 25 кг/м³) в возрасте от 23 до 42 лет, имеющих в анамнезе от 1 до 7 беременностей и не менее 1 родов. Забор крови в большинстве случаев осуществлялся на 4-7-й дни менструального цикла. Семь из 11 женщин на момент исследования не принимали лекарственные препараты в непрерывном режиме, в том числе комбинированные оральные контрацептивы. Исследования проводились после получения от всех участников письменного информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом центрифугирования гепаринизированной крови в градиенте плотности фикола-верографина ($\rho = 1,078$). Лизис эритроцитов при необходимости проводили раствором VersaLyse (BeckmanCoulter, Франция) в соответствии с инструкцией. Оценку «классических» (кМо, CD14⁺CD16⁻), «промежуточных» (пМо, CD14⁺CD16⁺) и «неклассических» (нМо, CD14⁺CD16⁺) моноцитов проводили по общепринятой методике с использованием PerCP, FITC- и PE-меченых моноклональных анти-*HLA-DR*, анти-*CD14* и анти-*CD16* антител, соответственно (BD PharMingen, США).

Относительное содержание MerTK⁺ клеток определяли в гейте *HLA-DR* (PerCP)-позитивных клеток с использованием AlexaFluor 647 анти-MerTK (Biolegend) антител. Для оценки внутриклеточной экспрессии аргиназы 1 (*Arg1*) клетки, меченные анти-*HLA-DR* антителами, обрабатывали пермеабилзирующими растворами (Transcription Factor Buffer Set, BD Pharmingen) и метили APC-конъюгированными анти-*Arg1* антителами (RD Systems).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и квартильного диапазона (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали U-критерий Манна–Уитни.

Результаты

Субпопуляции моноцитов

В периферической крови фертильных женщин (контрольная группа) доминирующая субпопуляция моноцитов была представлена классическими моноцитами (табл. 1), тогда как доля промежуточных и неклассических моноцитов совокупно не превышала 10%. Большинство клеток в общей популяции моноцитов (77%) экспрессировали молекулы *HLA-DR*. По сравнению с контрольной группой, у беременных наблюдалось достоверное увеличение относительного содержания *HLA-DR*⁺ моноцитов (89% vs 77%, $p = 0,037$). Также отмечалась выраженная тенденция к возрастанию доли промежуточных моноцитов. При этом регистрировалось снижение

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ В ЦИРКУЛЯЦИИ ЖЕНЩИН ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУПП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. RELATIVE CONTENT OF DIFFERENT MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE CIRCULATION OF WOMEN IN THE STUDY AND CONTROL GROUPS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы Groups	n	<i>HLA-DR</i>	кМо сМо CD14 ⁺ CD16 ⁻	пМо iМо CD14 ⁺ CD16 ⁺	нМо nМо CD14 ⁺ CD16 ⁺
Небеременные (контроль) Nonpregnant (Control)	11	77 (75-80)	88 (86-91)	3,9 (2,1-4,7)	2,6 (2,0-3,6)
Беременные (17-20 нед.) Pregnant (17-20 weeks)	20	89* (81-94)	90,5 (86-92)	4,6 (3,7-6,1)	2,1 (2,0-2,9)

Примечание. * – $p < 0,05$ – достоверность различий с контрольной группой (по критерию Манна–Уитни).

Note. *, $p < 0,05$, significance of differences with the control group (according to the Mann–Whitney test).

индекса соотношения кМо/пМо с 26,2 до 19,5 ($p = 0,05$).

Анализ экспрессии M2-ассоциированных маркеров в различных субпопуляциях моноцитов у фертильных небеременных показал (табл. 2), что минимальное содержание CD206⁺ клеток выявлялось среди кМо. Содержание этих клеток в субпопуляции пМо было двукратно, а в субпопуляции нМо – в 4 раза выше, чем в субпопуляции кМо, однако и в этом случае медианный уровень составлял 17%. Относительное содержание Arg1⁺ клеток также было минимальным в субпопуляции кМо (Me 31%) и существенно более высоким – в

субпопуляциях пМо и нМо (70-76%). Аналогичные закономерности были характерны и в отношении экспрессии MerTK, которая выявлялась в половине клеток в субпопуляции кМо, 71% клеток – в субпопуляции пМо и 79% клеток – в субпопуляции нМо. Таким образом, наибольшие различия в количестве CD206⁺, Arg1⁺ и MerTK⁺ клеток выявлялись между кМо и пМо, тогда как пМо и нМо не различались значимо по этим параметрам. Обращает на себя внимание тот факт, что более высокое содержание Arg1⁺ и MerTK⁺ клеток в субпопуляциях пМо и нМо (в сравнении с кМо) сопровождалось также усилением сред-

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ M2-АССОЦИИРОВАННЫХ МАРКЕРОВ НА МОНОЦИТАХ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ У ЖЕНЩИН КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EXPRESSION OF M2-ASSOCIATED MARKERS ON MONOCYTES OF VARIOUS SUBPOPULATIONS IN WOMEN IN THE CONTROL GROUP, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	CD206		Arg1		MerTK	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI
кМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ сМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	4,2 (4,1-6,4)	1733 (790-2588)	31 (19-53)	540 (200-610)	49,5 (43-53)	550 (260-640)
пМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ iМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	8,7* (8,4-23,0)	1035* (696-1427)	70** (53-75)	776** (480-900)	71** (63-87)	750* (320-1040)
нМо, CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ nМо, CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	17* (9,6-19,0)	1004 (710-1420)	76** (53-79)	806** (420-830)	79** (56-88)	720** (340-1020)

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – достоверность различий с кМо по критерию Манна–Уитни. MFI – средняя интенсивность флуоресценции.

Note. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, significance of differences with cMo according to the Mann–Whitney test. MFI, the mean fluorescence intensity.

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ M2-АССОЦИИРОВАННЫХ МАРКЕРОВ МОНОЦИТАМИ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. EXPRESSION OF M2-ASSOCIATED MARKERS BY MONOCYTES OF VARIOUS SUBPOPULATIONS IN PREGNANT WOMEN, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	CD206		Arg1		MerTK	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI
кМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ сМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	12# (6,6-20,0)	1895 (1306-3451)	30 (23-39)	690## (616-733)	69## (55-83)	842###** (798-912)
пМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ iМо, CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	16# (10-20)	1534* (930-2055)	59** (49-77)	878** # (744-1013)	88##** (74-91)	1350###** (1130-1540)
нМо, CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ nМо, CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	16 (12-30)	1080** (975-1398)	64,5** (48-80)	893** # (817-1125)	81,5** (75-89)	1432###** (1145-1970)

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – достоверность различий с кМо; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ – достоверность различий с соответствующим показателем в контрольной группе (небеременные) (критерий Манна–Уитни). MFI – средняя интенсивность флуоресценции.

Note. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, significance of differences with cMo; #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$, significance of differences with the corresponding indicator in the control group (non-pregnant) (Mann–Whitney test). MFI, the mean fluorescence intensity.

ней интенсивности флуоресценции, в то время как интенсивность флуоресценции CD206 в субпопуляциях пМо и нМо была, наоборот, ниже, чем в кМо ($p < 0,05$).

У беременных в популяции кМо 12% клеток экспрессировали CD206, одна треть – Arg1 и две трети моноцитов – MerTK (табл. 3). По сравнению с кМо, в популяциях пМо и нМо доля Arg1⁺ и MerTK⁺ клеток (но не CD206⁺) значимо возрастала (в 2 и 1,3 раза, соответственно). При этом нМо содержали достоверно больше Arg1⁺ клеток, чем пМо ($p < 0,05$). Подобно тому, как было выявлено в контрольной группе небеременных, увеличение экспрессии Arg1 и MerTK сопровождалось также усилением средней интенсивности флуоресценции, в то время как интенсивность флуоресценции CD206, наоборот, снижалась ($p < 0,05$).

При сравнении исследуемых групп содержание моноцитов, экспрессирующих M2-ассоциированные маркеры, у беременных было выше, чем у фертильных женщин контрольной группы. Так, у беременных в популяции кМо наблюдалось более высокое (трехкратно) содержание CD206⁺ и MerTK⁺ моноцитов и увеличение средней интенсивности флуоресценции MerTK. Относительное содержание Arg1⁺ клеток было сопоставимо с показателем контрольной группы, в то же время средняя интенсивность флуоресценции фермента была значимо выше. Аналогичные закономерности выявлялись также в популяции пМо (увеличение относительного содержания CD206⁺ и MerTK⁺ клеток, а также средней интенсивности флуоресценции Arg1). Субпопуляция нМо у беременных характеризовалась более высоким показателем средней интенсивности флуоресценции Arg1 и MerTK.

Обсуждение

Суммируя полученные данные, можно заключить, что у фертильных небеременных женщин субпопуляции промежуточных и неклассических моноцитов характеризуются более высокой экспрессией M2-ассоциированных маркеров (CD206, Arg1, MerTK) по сравнению с кМо. При беременности экспрессия указанных молекул на моноцитах статистически значимо возрастает. В отношении CD206 это проявляется возрастанием доли CD206⁺ клеток в субпопуляциях кМо и пМо, в отношении Arg1 – увеличением средней интенсивности флуоресценции во всех субпопуляциях моноцитов и в отношении MerTK – повышением доли MerTK⁺ клеток в субпопуляциях кМо и пМо и средней интенсивности флуоресценции во всех трех субпопуляциях моноцитов.

При этом наибольшее содержание CD206⁺ и MerTK⁺ клеток у беременных выявляется в субпопуляции пМо, а наиболее высокие показатели средней интенсивности флуоресценции Arg1 и MerTK – в субпопуляциях пМо и нМо.

Успешное вынашивание беременности требует существенной перестройки материнской иммунной системы [1], которой приходится одновременно обеспечивать толерантность к полуаллогенному плоду и защиту от микробных инфекций. Изменения в иммунной системе носят динамический характер [14]. Так, в 1-м триместре преобладает активность провоспалительных Th1-клеток, необходимых для имплантации и раннего развития эмбриона; во 2-м триместре – активность Th2-клеток, способствующих обеспечению толерантности иммунной системы к эмбриону; в конце 3-го триместра снова активируются Th1-клетки, участвующие в инициации родов [7]. Важная роль в динамичной регуляции баланса различных T-клеточных субпопуляций отводится клеткам врожденного иммунитета, в частности циркулирующим моноцитам и тканевым макрофагам на границе между матерью и плодом. Изменения функциональной активности наиболее ярко проявляются в отношении макрофагов на границе мать-плод [3, 11]. В то же время свойства периферических моноцитов, наиболее доступных для исследования и представляющих поэтому большой интерес в качестве потенциальных биомаркеров иммунной адаптации, остаются малоисследованными. Особенно это касается субпопуляции промежуточных моноцитов, которые, с одной стороны, обладают наиболее высокой антигенпрезентирующей способностью и способны стимулировать пролиферацию T-клеток [5], а с другой – могут участвовать в ограничении воспалительного ответа, являясь основными продуцентами противовоспалительного цитокина IL-10 [16].

Увеличение доли пМо при беременности в результате созревания кМо расценивается рядом авторов как проявление провоспалительного ответа, поскольку увеличение этой субпопуляции описано при многих воспалительных заболеваниях [5]. Однако недавно было показано, что данная субпопуляция играет иммунорегуляторную роль, обладая способностью усиливать продукцию IL-10 в Treg [12].

Заключение

В настоящем исследовании нами впервые охарактеризована экспрессия M2-ассоциированных молекул в субпопуляциях моноцитов человека,

в том числе у фертильных небеременных и беременных женщин, и показано, что моноциты беременных, которые по данным литературы имеют признаки активации [8], характеризуются во 2-м триместре беременности признаками М2-поляризации. Это подтверждается не только усилением экспрессии М2-ассоциированного маннозного рецептора CD206, но и усилением

экспрессии Arg1 и MerTK, опосредующих иммуносупрессивную активность миелоидных клеток и, в частности, макрофагов М2-фенотипа [2].

Дальнейшие исследования М2-ассоциированных маркеров в субпопуляциях моноцитов в динамике гестации позволят более детально охарактеризовать регуляторную роль циркулирующих миелоидных клеток при беременности.

Список литературы / References

1. Abu-Raya B., Michalski C., Sadarangani M., Lavoie P.M. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575197. doi: 10.3389/fimmu.2020.575197.
2. Arlauckas S.P., Garren S.B., Garris C.S., Kohler R.H., Oh J., Pittet M.J., Weissleder R. Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages. *Theranostics*, 2018, Vol. 8, no. 21, pp. 5842-5854.
3. Brown M.B., von Chamier M., Allam A.B., Reyes L. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 606. doi: 10.3389/fimmu.2014.00606.
4. Cai B., Kasikara C., Doran A.C., Ramakrishnan R., Birge R.B., Tabas I. MerTK signaling in macrophages promotes the synthesis of inflammation resolution mediators by suppressing CaMKII activity. *Sci. Signal.*, 2018, Vol. 11, no. 549, eaar3721. doi: 10.1126/scisignal.aar3721.
5. Cormican S., Griffin M.D. Human monocyte subset distinctions and function: insights from gene expression analysis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1070. doi: 10.3389/fimmu.2020.01070.
6. Crittenden M.R., Baird J., Friedman D., Savage T., Uhde L., Alice A., Cottam B., Young K., Newell P., Nguyen C., Bambina S., Kramer G., Akporiaye E., Malecka A., Jackson A., Gough M.J. MerTK on tumor macrophages is a therapeutic target to prevent tumor recurrence following radiation therapy. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, pp. 78653-78666.
7. Dutta S., Sengupta P. Defining pregnancy phases with cytokine shift. *J. Pregnancy Reprod.*, 2017, Vol. 1, pp. 1-3.
8. Faas M.M., de Vos P. Maternal monocytes in pregnancy and preeclampsia in humans and in rats. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 91-97.
9. Fadini G.P., de Kreutzenberg S.V., Boscaro E., Albiero M., Cappellari R., Krankel N., Landmesser U., Toniolo A., Bolego C., Cignarella A., Seeger F., Dimmeler S., Zeiher A., Agostini C., Avogaro A. An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy. *Diabetologia*, 2013, Vol. 56, no. 8, pp. 1856-1866.
10. Fukui S., Iwamoto N., Takatani A., Igawa T., Shimizu T., Umeda M., Nishino A., Horai Y., Hirai Y., Koga T., Kawashiri S.Y., Tamai M., Ichinose K., Nakamura H., Origuchi T., Masuyama R., Kosai K., Yanagihara K., Kawakami A. M1 and M2 monocytes in rheumatoid arthritis: a contribution of imbalance of M1/M2 monocytes to osteoclastogenesis. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 8, 1958. doi:10.3389/fimmu.2017.01958.
11. Jiang X., Wang H. Macrophage subsets at the maternal-fetal interface. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, pp. 889-891.
12. Liu B., Dhanda A., Hirani S., Williams E.L., Sen .N., Martinez Estrada F., Ling D., Thompson I., Casady M., Li Z., Si H., Tucker W., Wei L., Jawad S., Sura A., Dailey J., Hannes S., Chen P., Chien J.L., Gordon S., Lee R.W., Nussenblatt R.B. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes are enriched by glucocorticoid treatment and are functionally attenuated in driving effector T cell responses. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 11, pp. 5150-5160.
13. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.*, 2009, Vol. 158, pp. 638-651.
14. Peck A., Mellins E.D. Plasticity of T-cell phenotype and function: The T helper type 17 example. *Immunology*, 2010, Vol. 129, pp. 147-153.
15. Pflitsch C., Feldmann C.N., Richert L., Hagen S., Diemert A., Goletzke J., Hecher K., Jazbutyte V., Renné T., Arck P.C., Altfeld M., Ziegler S. In-depth characterization of monocyte subsets during the course of healthy pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 141, 103151. doi: 10.1016/j.jri.2020.103151.
16. Skrzeczynska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.*, 2008, Vol. 67, no. 2, pp. 152-159.

17. Wong K.L., Tai J.J., Wong W.C., Han H., Sem X., Yeap W.H., Kourilsky P., Wong S.C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 5, pp. 16-31.

18. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, pp. 74-80.

Авторы:

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Бухтуева Н.Г. — врач — акушер-гинеколог акушерского наблюдательного отделения № 1 ГБУЗ НСО «Городская больница № 1», г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Пасман Н.М. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии Института медицины и психологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shevela E. Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Bukhtueva N.G., Obstetrician-Gynecologist, Obstetric Observational Department No. 1, City Hospital No. 1. Novosibirsk, Russian Federation

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Lepkina O. Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pasman N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 20.05.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 20.05.2022
Accepted 22.05.2022

АССОЦИАЦИЯ УРОВНЯ ЦИТОКИНА IL-17A С ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОФИЛЕМ И РЕЗУЛЬТАТАМИ СТРУКТУРНОЙ МРТ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

**Малашенкова И.К.^{1,2}, Ушаков В.Л.^{3,4,5}, Крынский С.А.¹,
Огурцов Д.П.^{1,2}, Хайлов Н.А.¹, Ратушный А.Ю.⁶, Чекулаева Е.И.¹,
Захарова Н.В.³, Костюк Г.П.³, Дидковский Н.А.²**

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

³ ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 имени Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва, Россия

⁵ Институт перспективных исследований мозга ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁶ ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации «Институт медико-биологических проблем Российской академии наук», Москва, Россия

Резюме. IL-17A – провоспалительный цитокин, участвующий в патогенезе ряда сопровождающихся нейровоспалением заболеваний мозга, но его роль при шизофрении изучена недостаточно. В настоящее время методы неинвазивной нейровизуализации широко используются для изучения нарушений морфологии мозга и функциональных связей нейронных сетей при шизофрении. Целью данной работы было изучение ассоциаций между уровнем IL-17A и морфометрическими показателями мозга при шизофрении для уточнения иммунных факторов патогенеза и поиска биомаркеров неблагоприятного течения заболевания.

В исследование были включены 45 больных с шизофренией и 30 здоровых добровольцев. Уровень цитокинов (IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A) и маркеров воспаления определяли методом ИФА и мультиплексного анализа. МРТ-сканирование проводилось на МРТ-сканере Siemens Magnetom Verio 3T. Для оценки значимости различий по иммунологическим показателям использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующими попарными сравнениями по критерию Манна–Уитни, для оценки значимости различий по морфометрическим показателям использовали критерий Стьюдента, для

Адрес для переписки:

Малашенкова Ирина Константиновна
Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»
123182, Россия, Москва, площадь акад. Курчатова, 1.
Тел.: 8 (916) 935-73-09.
E-mail: malashenkova.irina@bk.ru

Address for correspondence:

Irina K. Malashenkova
National Research Center “Kurchatov Institute”
123182, Russian Federation, Moscow, Acad. Kurchatov sq., 1.
Phone: +7 (916) 935-73-09.
E-mail: malashenkova.irina@bk.ru

Образец цитирования:

И.К. Малашенкова, В.Л. Ушаков, С.А. Крынский, Д.П. Огурцов, Н.А. Хайлов, А.Ю. Ратушный, Е.И. Чекулаева, Н.В. Захарова, Г.П. Костюк, Н.А. Дидковский «Ассоциация уровня цитокина IL-17A с иммунновоспалительным профилем и результатами структурной МРТ при шизофрении» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1159-1170. doi: 10.15789/1563-0625-AOI-2528

© Малашенкова И.К. и соавт., 2022

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.K. Malashenkova, V.L. Ushakov, S.A. Krynskiy, D.P. Ogurtsov, N.A. Khailov, A.Yu. Ratushnyy, E.I. Chekulaeva, N.V. Zakharova, G.P. Kostyuk, N.A. Didkovsky “Association of IL-17A levels with immune-inflammatory profile and structural MRI data in patients with schizophrenia”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1159-1170. doi: 10.15789/1563-0625-AOI-2528

© Malashenkova I.K. et al., 2022

The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AOI-2528

оценки значимости различий по дискретным показателям использовали точный критерий Фишера, считая различия между показателями статистически значимыми при $p < 0,05$.

Обнаружено, что при шизофрении уровень IL-17A в среднем был увеличен. Его повышенное содержание было связано у больных с повышением уровня С-реактивного белка, цитокинов IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, а также с наличием морфометрических изменений лобной и височной коры мозга.

По данным анализа мировой литературы, не изучена связь уровня IL-17A с иммуновоспалительными показателями и структурными изменениями мозга при шизофрении. В данной работе обнаружена связь изменений средней толщины коры ряда областей мозга, признаков системного воспаления и активации Th2-звена иммунитета с повышенным уровнем IL-17A у больных с шизофренией. По данным литературы, ряд областей мозга, в которых толщина коры была ассоциирована с уровнем IL-17A, могут иметь отношение к патогенезу заболевания и, в частности, к развитию негативной симптоматики, включающей оскудение интересов, речи и эмоций. Результаты важны для понимания роли иммунных нарушений в патогенезе шизофрении, включая нарушения структуры мозга, и указывают, что IL-17A может являться биомаркером этих нарушений. Подтверждение корреляций между результатами структурной нейровизуализации, лабораторными маркерами воспаления и иммунных нарушений может стать основой для новых междисциплинарных подходов к диагностике и прогнозу шизофрении.

Ключевые слова: воспаление, интерлейкин-17A, магнитная резонансная томография, средняя толщина коры, цитокины, шизофрения

ASSOCIATION OF IL-17A LEVELS WITH IMMUNE-INFLAMMATORY PROFILE AND STRUCTURAL MRI DATA IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

Malashenkova I.K.^{a, b}, Ushakov V.L.^{c, d, e}, Krynskiy S.A.^a, Ogurtsov D.P.^{a, b}, Khailov N.A.^a, Ratushnyy A.Yu.^f, Chekulaeva E.I.^a, Zakharova N.V.^c, Kostyuk G.P.^c, Didkovsky N.A.^b

^a National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation

^b Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

^c N. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russian Federation

^d National Research Nuclear University (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation

^e Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^f Russian State Research Center "Institute of Biomedical Problems", Moscow, Russian Federation

Abstract. IL-17A is a proinflammatory cytokine involved in pathogenesis of some neuroinflammatory diseases of the brain. However, its role in schizophrenia is poorly understood. Currently, noninvasive neuroimaging techniques are widely used to assess abnormalities in brain morphology and interactions of neuronal networks in schizophrenia. The aim of this work was to study associations between IL-17A level and brain morphometric parameters in schizophrenia, in order to clarify immune factors of pathogenesis and search for biomarkers of unfavorable disease course.

45 patients with schizophrenia and 30 healthy volunteers were included into the study. The levels of cytokines (IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A) and inflammatory markers were determined by ELISA or multiplex analysis. MRI scans were performed with a Siemens Magnetom Verio 3T MRI scanner. We used Kruskal–Wallis test to assess significant differences in immunological parameters followed by Mann–Whitney paired comparison; Student test to assess the significance of differences in morphometric parameters of the brain; Fisher exact test to assess the differences in discrete variables, with the differences considered statistically significant at $p < 0.05$.

IL-17A levels were found to be increased in schizophrenia. Its elevated content was associated with increased levels of C-reactive protein, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, and the presence of morphometric changes of frontal and temporal cortex in the patients.

So far, the relationships between IL-17A levels, immunoinflammatory parameters and structural brain changes have not been studied in schizophrenia. In the present work, we found an association of elevated IL-17A levels with decreased cortical thickness in several brain regions, systemic inflammation and activation of Th2-link of adaptive immunity in the patients with schizophrenia. According to the literature, a number of

brain areas, where cortical thickness was associated with IL-17A levels may be relevant to pathogenesis of the disease and, in particular, to the development of negative symptoms, including impoverishment of interests, speech, and emotions. The results are important for understanding the role of immune disorders in pathogenesis of schizophrenia, including structural changes of the brain, and suggest that IL-17A may be a biomarker of these disorders. Confirmation of associations between structural neuroimaging findings, laboratory markers of inflammation and immune disorders may provide the basis for new multidisciplinary approaches to the diagnosis and prognosis of schizophrenia.

Keywords: cytokines, cortical thickness, inflammation, interleukin-17A, magnetic resonance imaging, schizophrenia

Работа выполнена при поддержке Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (подпункт 1.8 «Разработка основ инновационных биомедицинских технологий диагностики и терапии ряда социально значимых заболеваний» пункта 1Ф.1 Тематического плана НИОКР на 2022 г.) и частично при поддержке РФФИ (грант № 20-15-00299).

Введение

Нейроиммунные взаимодействия обеспечивают гомеостаз и нормальное функционирование как центральной нервной системы (ЦНС), так и иммунной системы, с использованием для коммуникаций нейромедиаторов, гормонов и цитокинов. Предполагают, что нарушения этих взаимодействий являются факторами патогенеза и развития структурных изменений мозга при ряде заболеваний ЦНС, в том числе шизофрении (ШЗ). Показано, что иммунные нарушения и нейровоспаление играют критическую роль в патогенезе психических болезней [8, 14]. В настоящее время растет число работ, использующих методы неинвазивной нейровизуализации для изучения нарушений морфологии мозга и функциональных связей нейронных сетей при шизофрении. Так, при шизофрении выявлены структурные и функциональные нарушения в различных областях мозга, включая лимбическую систему, таламус, базальные ганглии и префронтальную кору [3, 20].

Доказательства наличия нейровоспаления, иммунных расстройств, системного воспаления и оксидативного стресса при ШЗ получены при изучении постмортального мозга, на экспериментальных животных, при клинических исследованиях и в полногеномных ассоциативных исследованиях (GWAS) [12, 21, 24, 25, 26, 28]. Так, при обострениях ШЗ имеет место повышение уровня провоспалительных цитокинов в ликворе и крови, а также увеличение транскрипции белков иммунной системы в префронтальной коре мозга [12, 21, 24]. По данным GWAS, имеется связь полиморфизмов ряда генов иммунного ответа с риском развития ШЗ [13, 27].

Показано, что на разных этапах развития и клинического течения ШЗ повышаются уровни белков острой фазы, макрофагальные и лимфоцитарные провоспалительные факторы, включая цитокины и хемокины клеток естественного и адаптивного иммунитета, а также противовоспалительные белки. Описанные нарушения могут по-разному сочетаться у больных ШЗ, создавая многочисленные иммунные паттерны, и предполагают, что они могут нарушать сигнальные и метаболические пути на периферии и в головном мозге [23]. Ряд исследований указывают на связь характера и выраженности иммунологических расстройств с прогнозом шизофрении и характером симптоматики заболевания [9, 18, 27].

IL-17A – провоспалительный цитокин, продуцируемый преимущественно Т-хелперами 17-го типа (Th17). Также он может синтезироваться активированными лимфоцитами, включая CD3⁺CD4⁺ клетки, CD3⁺CD8⁺ клетки, $\gamma\delta$ T-клетки, инвариантные NKT-клетки и врожденные лимфоидные клетки (ILC). Стимулируя активность транскрипционного фактора NF- κ B и митоген-активируемых протеинкиназ, IL-17A индуцирует экспрессию медиаторов системного воспаления: IL-6 и циклооксигеназы-2, а также оксида азота. Т-хелперы, продуцирующие IL-17A (Th17-клетки), в настоящее время рассматриваются как самостоятельный класс Т-хелперов. Th17-клетки важны для иммунного ответа на внеклеточные патогены бактериальной и грибковой природы, а также в поддержании иммунологических барьеров слизистых оболочек. Расстройства регуляции Th17-звена иммунитета вовлечены в патогенез ряда аутоиммунных заболеваний, включая рассеянный склероз, системную красную волчанку, сахарный диабет 1-го типа [1]. При рассеянном склерозе их роль особенно важна на начальных этапах аутоиммунного воспаления ЦНС и демиелинизации [31]. IL-17A также участвует в патогенезе постинсультных воспалительных повреждений ЦНС, вызывая патологическую активацию микроглии и астроцитов [32]. Изучаются механизмы вовлечения Th17 и IL-17A в развитие большого депрессивного расстройства [2].

В то же время роль IL-17A в развитии и прогрессировании шизофрении, включая участие этого цитокина в развитии структурных изменений мозга у больных, остается малоизученной [4, 11].

Ранее нами сообщалось об ассоциации уровня цитокинов врожденного иммунитета с изменениями показателей структурной МРТ при шизофрении. Очевидно, что в патогенезе шизофрении важную роль играет как врожденный, так и адаптивный иммунитет [17, 18].

С учетом свойств IL-17A можно предположить его участие в нейровоспалении и развитии морфометрических изменений головного мозга у больных ШЗ.

Целью данной работы было изучение ассоциаций между уровнем IL-17A и результатами структурной МРТ для уточнения иммунных факторов патогенеза и поиска биомаркеров неблагоприятного течения ШЗ.

Материалы и методы

В исследование вошли 45 больных с шизофренией, проходивших лечение в психиатрической клинической больнице № 1 им. Н.А. Алексеева. Контролем служили 30 человек без психических расстройств, сопоставимых с больными по полу и возрасту, без признаков психических расстройств и не состоящих в родстве с больными шизофренией или другими психическими заболеваниями. Основные социально-демографические и клини-

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ СОЦИАЛЬНО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ И ДОБРОВОЛЬЦЕВ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. MAIN SOCIAL-DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA AND THE VOLUNTEERS OF THE CONTROL GROUP

	Шизофрения Schizophrenia n = 45	Контроль Controls n = 30
Возраст на дату обследования, лет Age on the date of assessment, years	28,5±2,0	28,3±2,6
Мужчины Men	28 (62,2%)	13 (43,3%)
Женщины Women	17 (37,8%)	17 (56,7%)
Средняя продолжительность заболевания, лет Mean duration of the disease, years	4,6±1,2	–
Средний возраст начала продромальных симптомов, лет Mean age of onset of the prodromal symptoms, years	18,3±1,7	–
Средний возраст манифестации, лет Mean age of manifestation, years	23,3±2,1	–
PANSS (Шкала позитивных и негативных симптомов), баллы PANSS (Positive and negative symptoms scale), points	92,2±7,4	36,0±1,9
NSA-4 (Шкала оценки негативных симптомов), баллы NSA-4 (Negative symptoms assessment scale), points	20,4±1,9	5,0±0,0
BFCRS (Шкала Буша–Фрэнсиса для оценки кататонии), баллы BFCRS (Bush–Francis Catatonia Rating Scale), points	6,3±2,1	0,0±0,0

ческие характеристики больных шизофренией и здоровых добровольцев приведены в таблице 1.

Для психометрического и нейропсихологического исследований больных применялись следующие тесты и шкалы: шкала оценки позитивных и негативных симптомов (PANSS), шкала кататонии Буша—Франциса (BFCRS), шкала оценки негативных симптомов NSA-4, батарея тестов лобной дисфункции (FAB).

Иммунологическое исследование и МРТ-сканирование были проведены в период становления ремиссии со значительной редукцией позитивной симптоматики и формированием критики к перенесенному психозу.

Сывороточный уровень маркеров воспаления (циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), С-реактивный белок (СРБ), кортизол), цитокинов IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A определяли методом ELISA. Для определения уровня цитокина IL-5 использовали набор для мультиплексного анализа (Merck, США).

МРТ-сканирование выполнялось на базе Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий в НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия) на магнитно-резонансном томографе Siemens Magnetom Verio 3T (Siemens GmbH, Германия). Для получения данных была использована 32-канальная катушка для головного мозга. Для проведения гирификации, морфометрии серого и белого вещества, объема ликвора для каждого испытуемого были получены анатомические данные с высоким разрешением на основе T1-взвешенной последовательности (TR = 1900 мс, TE = 2,21 мс, 176 срезов, размер вокселя $1 \times 1 \times 1$ мм³). Freesurfer – это программный пакет с открытым исходным кодом, предназначенный для обработки и анализа МРТ головного мозга человека. Все полученные структурные изображения были проанализированы на суперкомпьютере НИЦ «Курчатовский институт» в программе Freesurfer. Данная программа позволила провести удаление черепа из изображений, подкорковую и корковую сегментации, реконструкцию кортикальной поверхности, оценку кортикальной толщины и полную морфометрию головного мозга. Также на полученных после анализа в программе Freesurfer данных был произведен расчет индекса локальной гирификации головного мозга.

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом НИЦ «Курчатовский институт» (№ 5 от 05.04.2017 года). Все участники были ознакомлены с деталями исследования и подписывали лист добровольного

информированного согласия и согласие на обработку персональных данных. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации 1975 года и ее пересмотренного варианта 2013 г.

Для статистической обработки применяли программное обеспечение Excel (Microsoft, 2010), Statistica 10 (StatSoft, 2010). Оценка нормальности распределения проводили по критерию Шапиро—Уилка. Иммунологические показатели представляли в виде медиан с 25 и 75 квартилями, клинические и морфометрические показатели представляли в виде средних с 95% доверительными интервалами. Для оценки значимости различий по иммунологическим показателям использовали критерий Краскела—Уоллиса с последующими попарными сравнениями по критерию Манна—Уитни, для оценки значимости различий по морфометрическим показателям использовали критерий Стьюдента, для оценки значимости различий по дискретным показателям использовали точный критерий Фишера, считая различия между показателями статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Системное воспаление и активация адаптивного иммунитета у больных шизофренией

Обнаружено, что у больных шизофренией уровень IL-17A в среднем был повышен ($p < 0,005$ по точному критерию Фишера). У 22 больных его содержание было ниже порога определения, не достигая 5 пг/мл, и у 23 больных было выше 5 пг/мл (медиана 55,77 пг/мл, 25 и 75 квартили: 21,02 пг/мл; 133,22 пг/мл). Среди добровольцев контрольной группы содержание IL-17A было выше 5 пг/мл только у 2 человек, в остальных случаях не достигая порога определения. При этом увеличение содержания IL-17A сопровождалось у больных ШЗ признаками активации системного воспаления и адаптивного иммунитета. Так, у больных с повышением уровня IL-17A отмечалось увеличение содержания С-реактивного белка ($p < 0,01$), провоспалительных цитокинов IL-6 ($p < 0,01$) и IL-8 ($p < 0,05$), противовоспалительного цитокина IL-10 ($p < 0,05$) (рис. 1, 2, 3).

По данным мультиплексного анализа, у больных с высоким уровнем IL-17A был также повышен уровень одного из ключевых Th2-цитокинов, IL-5 ($6,46 \pm 0,88$ пг/мл и $2,83 \pm 0,76$ пг/мл; $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

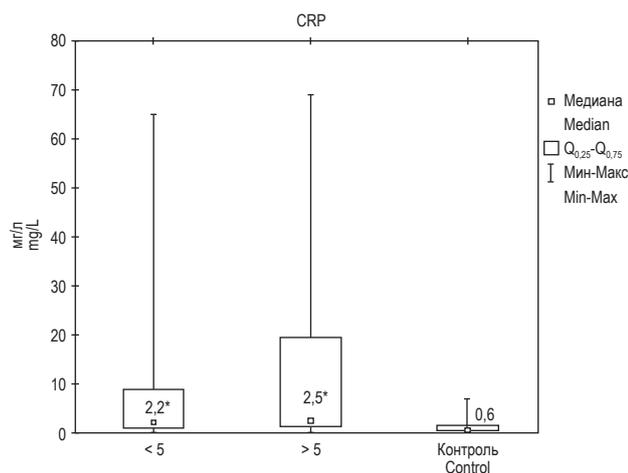


Рисунок 1. Уровень С-реактивного белка у больных шизофренией с уровнем IL-17A выше 5 пг/мл (n = 22), ниже 5 пг/мл (n = 23) и в контрольной группе (n = 30)

Примечание. * – достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$.

Figure 1. C-reactive protein levels in schizophrenia patients with IL-17A > 5 pg/mL (n = 22), IL-17A < 5 pg/mL (n = 23) and in the control group (n = 30)

Note. *, statistically significant differences with the control group ($p < 0.05$).

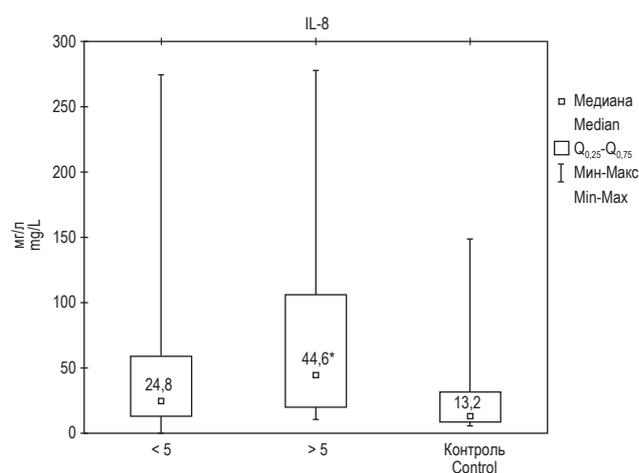


Рисунок 2. Уровень IL-8 у больных шизофренией с уровнем IL-17A выше 5 пг/мл (n = 22), ниже 5 пг/мл (n = 23) и в контрольной группе (n = 30)

Примечание. * – достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$.

Figure 2. IL-8 levels in schizophrenia patients with IL-17A > 5 pg/mL (n = 22), IL-17A < 5 pg/mL (n = 23) and in the control group (n = 30)

Note. *, statistically significant differences with the control group ($p < 0.05$).

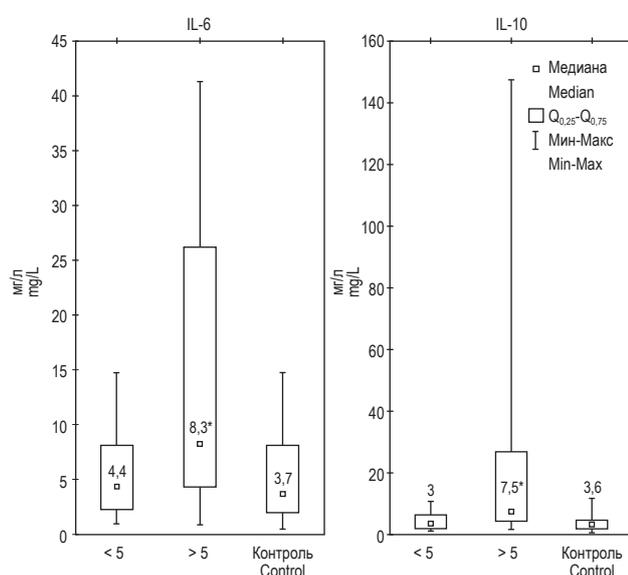


Рисунок 3. Уровень IL-6 и IL-10 у больных шизофренией с уровнем IL-17A выше 5 пг/мл (n = 22), ниже 5 пг/мл (n = 23) и в контрольной группе (n = 30)

Примечание. * – достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$.

Figure 3. IL-6 and IL-10 levels in schizophrenia patients with IL-17A > 5 pg/mL (n = 22), IL-17A < 5 pg/mL (n = 23) and in the control group (n = 30)

Note. *, statistically significant differences with the control group ($p < 0.05$).

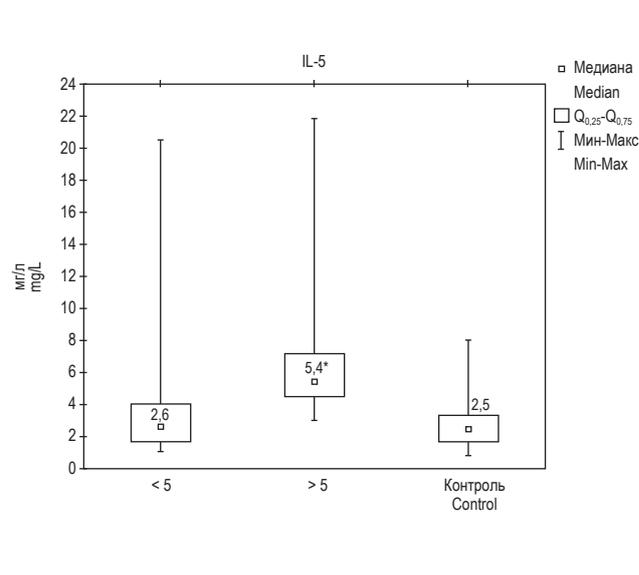


Рисунок 4. Уровень IL-5 у больных шизофренией с уровнем IL-17A выше 5 пг/мл (n = 22), ниже 5 пг/мл (n = 23) и в контрольной группе (n = 30)

Примечание. * – достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$.

Figure 4. IL-5 levels in schizophrenia patients with IL-17A > 5 pg/mL (n = 22), IL-17A < 5 pg/mL (n = 23) and in the control group (n = 30)

Note. *, statistically significant differences with the control group ($p < 0.05$).

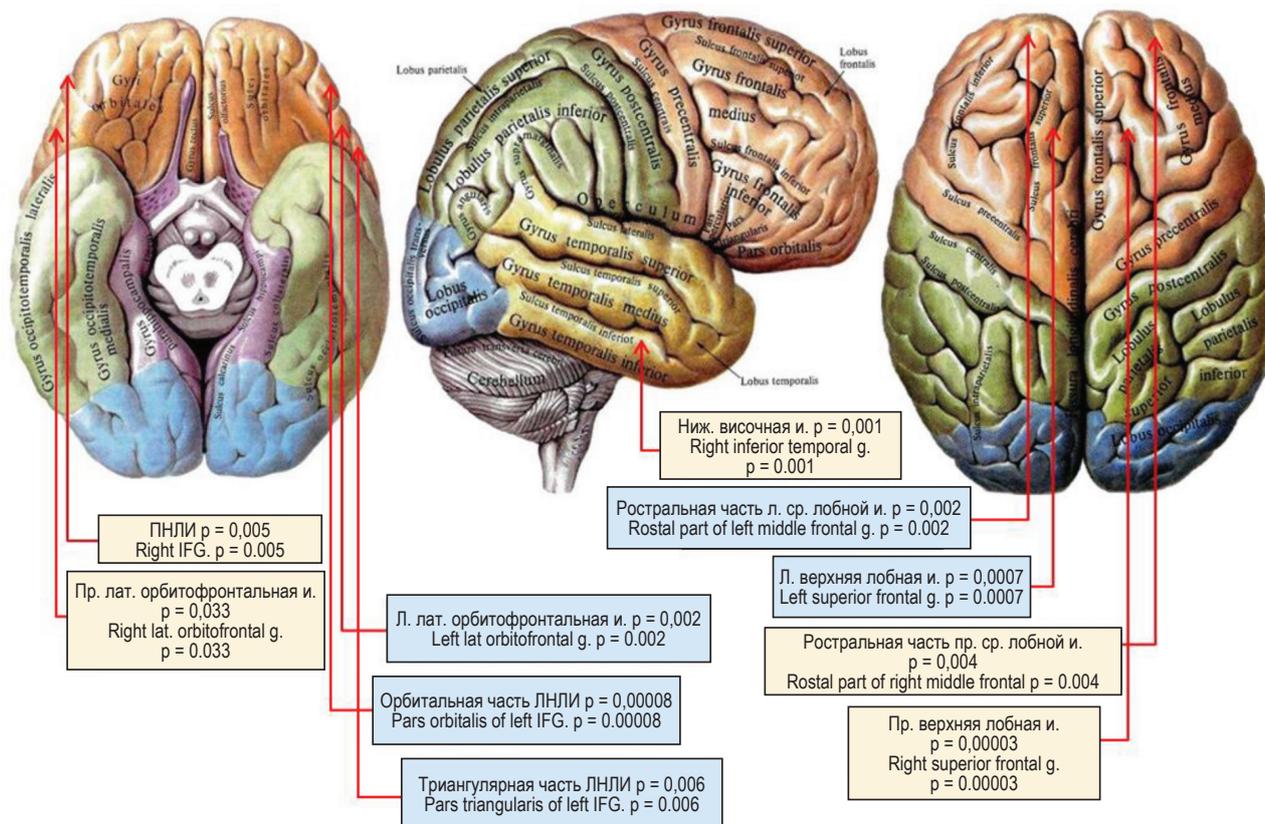


Рисунок 5. У больных шизофренией высокий уровень IL-17A коррелирует с уменьшением средней толщины коры больших полушарий мозга по данным МРТ

Примечание. ПНЛИ – правая нижняя лобная извилина, ЛНЛИ – левая нижняя лобная извилина, и. – извилина. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,005$.

Figure 5. Elevated IL-17A levels are associated with a decrease of mean cortical thickness in a number of areas of the brain in the patients with schizophrenia as assessed by MRI

Note. IFG, inferior frontal gyrus; g., gyrus. Differences were considered significant with $p < 0,005$.

Связь уровня IL-17A с результатами структурной визуализации мозга

Было впервые выявлено, что больные с уровнем IL-17A > 5 пг/мл имели достоверное снижение по сравнению с контрольной группой показателя средней толщины в ряде зон лобной и височной коры правого полушария и левого полушария (табл. 2, рис. 5).

Обсуждение

В рамках данной работы обнаружена связь структурных изменений мозга, признаков системного воспаления и активации адаптивного иммунитета у больных с шизофренией с повышенным уровнем IL-17A. Важен вопрос о том, может ли повышенный уровень IL-17A способствовать нейровоспалению и повреждению ЦНС

при шизофрении. В настоящее время интенсивно изучается роль IL-17A в развитии нейродегенеративных заболеваний и воспалительных заболеваний ЦНС. Основной мишенью IL-17A в ЦНС являются микроглиальные клетки, а также астроциты. Важным компонентом патогенеза таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз является патологическая активация клеток глии, повышение уровня медиаторов воспаления в паренхиме ЦНС. Патогенетическая роль IL-17A при этих заболеваниях связана с тем, что он стимулирует нейровоспаление, вызывая синтез провоспалительных цитокинов микроглией, повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), способствует избыточной активации глутаматергической нейротрансмиттерной

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СРЕДНЕЙ ТОЛЩИНЫ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

TABLE 2. MEAN CORTICAL THICKNESS IN THE PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA AND IN THE CONTROL GROUP

Средняя толщина, мм Mean thickness, mm	Шизофрения Schizophrenia (n = 45)		Контроль Controls (n = 30)
	IL-17A < 5 пг/мл IL-17A < 5 pg/mL	IL-17A > 5 пг/мл IL-17A > 5 pg/mL	
Правая нижняя височная извилина Inferior temporal gyrus (right)	2,93±0,09	2,84±0,14 p = 0,001	2,98±0,12
Правая латеральная орбитофронтальная извилина Lateral orbitofrontal gyrus (right)	2,72±0,13	2,70±0,12 p = 0,003	2,81±0,11
Покрышечная часть правой нижней лобной извилины (ПНЛИ) Pars opercularis of the inferior frontal gyrus (IFG) (right)	2,62±0,16	2,54±0,12 p = 0,001	2,71±0,13
Орбитальная часть ПНЛИ Pars orbitalis of the inferior frontal gyrus (IFG) (right)	2,84±0,18	2,79±0,22 p = 0,005	2,97±0,18
Триангулярная часть ПНЛИ Pars triangularis of the inferior frontal gyrus (IFG) (right)	2,52±0,09	2,47±0,15 p = 0,0006	2,64±0,15
Ростральная часть правой средней лобной извилины Rostral part of the middle frontal gyrus (right)	2,46±0,13	2,39±0,12 p = 0,004	2,53±0,16
Правая верхняя лобная извилина Superior frontal gyrus (right)	2,81±0,09	2,75±0,10 p = 0,00003	2,93±0,14
Левая латеральная орбитофронтальная извилина Lateral orbitofrontal gyrus (left)	2,76±0,13	2,71±0,10 p = 0,002	2,83±0,12
Орбитальная часть левой нижней лобной извилины (ЛНЛИ) Pars orbitalis of the inferior frontal gyrus (IFG) (left)	2,82±0,20	2,71±0,19 p = 0,00008	2,96±0,17
Триангулярная часть ЛНЛИ Pars triangularis of the inferior frontal gyrus (IFG) (left)	2,50±0,14	2,47±0,16 p = 0,006	2,60±0,14
Ростральная часть левой средней лобной извилины Rostral part of the middle frontal gyrus (left)	2,48±0,12	2,42±0,10 p = 0,002	2,54±0,13
Левая верхняя лобная извилина Superior frontal gyrus (left)	2,82±0,09	2,77±0,12 p = 0,0007	2,92±0,13

Примечание. Указана достоверность различий с контрольной группой p < 0,005.

Note. Only the areas where there is a significant (p < 0.005) difference with the control group are shown.

системы, что приводит к эксайтотоксическому повреждению нейронов, оказывает угнетающее действие на нейрогенез в гиппокампе [16]. Источником IL-17A в условиях воспаления могут служить резидентные клетки ЦНС, в основном клетки микроглии. Кроме того, в условиях нарушения проницаемости ГЭБ, показана возможность инфильтрации в ЦНС Th17 Т-хелперов, в значительном количестве синтезирующих IL-17A и другие цитокины (IL-17F, IL-21, IL-22), способствующие миграции в ЦНС иммунных клеток, окислительному стрессу и повреждению нейронов [5, 7].

Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности изучения IL-17A в качестве возможного маркера как системных иммунных расстройств, так и структурных изменений мозга ШЗ. Данных литературы по этому вопросу немного. Согласно [5], у нелеченных больных с первым психотическим эпизодом уровень IL-17A был повышен и не снижался через 10 недель после монотерапии рисперидоном [5]. По другим данным, уровень IL-17A у больных шизофренией коррелировал с выраженностью позитивных симптомов (бред, галлюцинации), общих психопатологических симптомов и с общим числом баллов по шкале PANSS (шкала оценки позитивных и негативных симптомов при шизофрении). У больных с числом баллов PANSS более 85, что соответствует высокой степени выраженности симптоматики, отмечался достоверно более высокий уровень IL-17A, чем при числе баллов 71-85 [6]. В то же время у находившихся в ремиссии больных шизофренией, получавших клозапин, уровень IL-17A не отличался от нормы [10].

По данным анализа мировой литературы, не изучена связь повышенного уровня IL-17A при шизофрении с активацией системного воспаления, дисбалансом Th1- и Th2-звена адаптивного иммунитета при шизофрении. В данной работе впервые показано, что повышенный уровень IL-17A является при шизофрении показателем комплексной активации врожденного иммунитета и Th2-звена адаптивного иммунитета.

Анализ литературы показывает также, что, несмотря на наличие данных об ассоциации повышения уровня IL-17A с клиническими характеристиками шизофрении, не изучено возможное значение этого цитокина как маркера морфометрических изменений при шизофрении.

В данной работе впервые выявлены ассоциации между уровнем IL-17A и толщиной коры больших полушарий у больных шизофренией. При этом ряд областей, в которых толщина коры проявляла взаимосвязь с уровнем IL-17A, могут иметь отношение к патогенезу заболевания и, в частности, к развитию негативной симптоматики, включающей оскудение интересов, речи и эмоций. К таким областям относится нижняя лобная извилина, которая входит в префронтальную кору и делится на различные по цитоархитектонике зоны: покрывчатую, треугольную и орбитальную части. В пределах нижней лобной извилины доминантного полушария находится зона Брока, отвечающая за речевые функции. К важным функциям левой покрывчатой зоны доминантного полушария относится распознавание интонации устной речи. Треугольная зона доминантного полушария, по некоторым данным, обеспечивает процесс перевода с выученных иностранных языков на родной язык. Орбитальная зона также участвует в обработке языковой информации. Правая покрывчатая и правая орбитальная зона участвуют в торможении импульсивного поведения и в регуляции готовности к принятию риска [29].

Имеются данные, что как для шизотипического расстройства, так и для шизофрении характерно уменьшение толщины коры в области правой нижней лобной извилины [30]. Показано, что при шизофрении имеет место увеличение латентного времени активации (delayed activity timing) префронтальной коры [15], к которой относится нижняя лобная извилина. Имеется одна работа, в которой показана отрицательная корреляция между баллами по шкале PANSS N и активацией нижней лобной извилины при шизофрении ($p = 0,046$, $r = -0,723$) [22].

Отметим, что по данным наших предыдущих исследований [18, 19], структурные изменения при МРТ, часть из которых по результатам данной работы ассоциирована с повышенным уровнем IL-17A, также связаны с наличием у больных выраженной негативной симптоматики. Это указывает на роль IL-17A не только в качестве показателя выраженной активации провоспалительных механизмов и дисрегуляции адаптивного иммунитета у больных шизофренией, но и как потенциального биомаркера клинически значи-

мых структурных нарушений мозга при шизофрении.

Заключение

В данной работе впервые выявлено, что повышенный уровень цитокина IL-17A связан с морфометрическими изменениями лобной коры мозга у больных ШЗ, а также ассоциирован с признаками системного воспаления и активации Th2-звена адаптивного иммунитета.

Полученные данные вносят важный вклад в понимание роли иммунных факторов в патогенезе шизофрении, в том числе в нарушении структуры мозга, и указывают, что IL-17A может быть участником и биомаркером этих на-

рушений. Необходима валидация полученных данных в более крупных исследованиях, оценка взаимосвязи структурных и функциональных нарушений ЦНС с иммунными показателями при шизофрении в динамике наблюдения. Перспективна трансляция полученных данных и методов в практическую деятельность для прогноза характера течения болезни, развития структурных нарушений мозга и подбора терапии.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ГБУЗ ПКБ № 1 ДЗМ, принимавшим участие в диагностике и отборе больных для участия в исследовании.

Список литературы / References

1. Bedoya S.K., Lam B., Lau K., Larkin J.3rd. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, 986789. doi: 10.1155/2013/986789.
2. Beurel E., Lowell J.A. Th17 cells in depression. *Brain Behav. Immun.*, 2018, Vol. 69, pp. 28-34.
3. Bogerts B. The temporolimbic system theory of positive schizophrenic symptoms. *Schizophr. Bull.*, 1997, Vol. 23, no. 3, pp. 423-435.
4. Borovcanin M.M., Minic Janicijevic S., Jovanovic I.P., Gajovic N.M., Jurisevic M.M., Arsenijevic N.N. Type 17 Immune response facilitates progression of inflammation and correlates with cognition in stable schizophrenia. *Diagnostics (Basel)*, 2020, Vol. 10, no. 11, 926. doi: 10.3390/diagnostics10110926.
5. Chen J., Liu X., Zhong Y. Interleukin-17A: The key cytokine in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.*, 2020, Vol. 12, 566922. doi: 10.3389/fnagi.2020.566922.
6. Chenniappan R., Nandeesha H., Kattimani S., Nanjaiah N.D. Interleukin-17 and Interleukin-10 association with disease progression in schizophrenia. *Ann. Neurosci.*, 2020, Vol. 27, no. 1, pp. 24-28.
7. Cipollini V., Anrather J., Orzi F., Iadecola C. Th17 and cognitive impairment: possible mechanisms of action. *Front. Neuroanat.*, Vol. 2019, no. 13, 95. doi: 10.3389/fnana.2019.00095.
8. Corsi-Zuelli F.M.D.G., Brognara F., Quirino G.F.D.S., Hiroki C.H., Fais R.S., Del-Ben C.M., Ulloa L., Salgado H.C., Kanashiro A., Loureiro C.M. Neuroimmune interactions in schizophrenia: focus on vagus nerve stimulation and activation of the Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 618. doi: 10.3389/fimmu.2017.00618.
9. de Witte L.D., van Mierlo H.C., Litjens M., Klein H.C., Bahn S., Osterhaus A. D., and GROUP Investigators. The association between antibodies to neurotropic pathogens and schizophrenia: a case-control study. *NPJ Schizophr.*, 2015, Vol. 1, 15041. doi: 10.1038/npjpsz.2015.41.
10. Eftekharian M.M., Omrani M.D., Arsang-Jang S., Taheri M., Ghafouri-Fard S. Serum cytokine profile in schizophrenic patients. *Hum. Antibodies*, 2019, Vol. 27, no. 1, pp. 23-29.
11. El Kissi Y., Samoud S., Mtiraoui A., Letaief L., Hannachi N., Ayachi M., Ali B., Boukadida J. Increased Interleukin-17 and decreased BAFF serum levels in drug-free acute schizophrenia. *Psychiatry Res.*, 2015, Vol. 225, no. 1-2, pp. 58-63.
12. Goldsmith D.R., Rapaport M.H., Miller B.J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Mol. Psychiatry*, 2016, Vol. 21, no. 12, pp. 1696-1709.

13. International Schizophrenia Consortium, Purcell S.M., Wray N.R., Stone J.L., Visscher P.M., O'Donovan M.C., Sullivan P.F., Sklar P. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*, 2009, Vol. 460, no. 7256, pp. 748-752.
14. Kaladjian A., Belzeaux R., Adida M., Azorin J.M. Negative symptoms and cerebral imaging. *Encephale*, 2015, Vol. 4, no. 6, Suppl 1, pp. 6S22-6S26.
15. Koike S., Sakakibara E., Satomura Y., Sakurada H., Yamagishi M., Matsuoka J., Okada N., Kasai K. Shared functional impairment in the prefrontal cortex affects symptom severity across psychiatric disorders. *Psychol. Med.*, 2020, Vol. 18, pp. 1-10.
16. Liu Q., Xin W., He P., Turner D., Yin J., Gan Y., Shi F.D., Wu J. Interleukin-17 inhibits adult hippocampal neurogenesis. *Sci. Rep.*, 2014, Vol. 4, 7554. doi: 10.1038/srep07554.
17. Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Ogurtsov D.P., Mamoshina M.V., Zakharova N.V., Ushakov V.L., Velichkovsky B.M., Didkovsky N.A. A role of the immune system in the pathogenesis of schizophrenia. *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2018, Vol. 118, no. 12, pp. 72-80. [In Russ.]
18. Malashenkova I.K., Ushakov V.L., Krynskiy S.A., Ogurtsov D.P., Khailov N.A., Zakharova N.V., Chekulaeva E.I., Orlov V.A., Kartashov S.I., Andreyuk D.S., Didkovsky N.A., Kostyuk G.P. The relationship of morphometric changes of the brain with IL-6 levels, systemic inflammation and immune disturbances in the patients with schizophrenia. *Procedia Computer Science*, 2021, Vol. 190, pp. 553-559.
19. Malashenkova I.K., Ushakov V.L., Zakharova N.V., Krynskiy S.A., Ogurtsov D.P., Hailov N.A., Chekulaeva E.I., Ratushnyy A.Y., Kartashov S.I., Kostyuk G.P., Didkovsky N.A. Neuro-immune aspects of schizophrenia with severe negative symptoms: new diagnostic markers of disease phenotype. *Modern Technologies in Medicine*, 2021, Vol. 13, no. 6, pp. 24-33.
20. McKenna P.J. What works in schizophrenia: cognitive behaviour therapy is not effective. *BMJ*, 2006, Vol. 333, no. 7563, 353. doi: 10.1136/bmj.333.7563.353-a.
21. Miller B.J., Buckley P., Seabolt W., Mellor A., Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol. Psychiatry*, 2011, Vol. 70, no. 7, pp. 663-671.
22. Nazli Ş.B., Koçak O.M., Kirkici B., Sevindik M., Kokurcan A. Investigation of the processing of noun and verb words with fMRI in patients with schizophrenia. *Noro Psikiyat. Ars.*, 2019, Vol. 57, no. 1, pp. 9-14.
23. Neugebauer K., Hammans C., Wensing T., Kumar V., Grodd W., Mevissen L., Sternkopf M.A., Novakovic A., Abel T., Habel U., Nickl-Jockschat T. Nerve growth factor serum levels are associated with regional gray matter volume differences in schizophrenia patients. *Front. Psychiatry*, 2019, Vol. 10, 275. doi: 10.3389/fpsy.2019.00275.
24. Potvin S., Stip E., Sepehry A.A., Gendron A., Bah R., Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol. Psychiatry*, 2008, Vol. 63, no. 8, pp. 801-808.
25. Ruzzo E.K., Geschwind D.H. Schizophrenia genetics complements its mechanistic understanding. *Nat Neurosci.*, 2016, Vol. 19, no. 4, pp. 523-525.
26. Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G., Koyama R., Mardinly A.R., Yamasaki R., Ransohoff R.M., Greenberg M.E., Barres B.A., Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 2012, Vol. 74, no. 4, pp. 691-705.
27. Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat. Genet.*, 2011, Vol. 43, no. 10, pp. 969-976.
28. Sekar A., Bialas A.R., de Rivera H., Davis A., Hammond T.R., Kamitaki N., Tooley K., Presumey J., Baum M., van Doren V., Genovese G., Rose S.A., Handsaker R.E., Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Daly M.J., Carroll M.C., Stevens B., McCarroll S.A. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*, 2016, Vol. 530, no. 7589, pp. 177-183.
29. Steines M., Nagels A., Kircher T., Straube B. The role of the left and right inferior frontal gyrus in processing metaphoric and unrelated co-speech gestures. *Neuroimage*, 2021, Vol. 15, no. 237, 118182. doi: 10.1016/j.neuroimage.2021.118182.
30. Takayanagi Y., Sasabayashi D., Takahashi T., Furuichi A., Kido M., Nishikawa Y., Nakamura M., Noguchi K., Suzuki M. Reduced cortical thickness in schizophrenia and schizotypal disorder. *Schizophr. Bull.*, 2020, Vol. 46, no. 2, pp. 387-394.

31. Rostami A., Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J. Neurol. Sci.*, 2013, Vol. 333, no. 1-2, pp. 76-87.

32. Waisman A., Hauptmann J., Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol.*, 2015, Vol. 129, no. 5, pp. 625-637.

Авторы:

Малашенкова И.К. — к.м.н., начальник лаборатории молекулярной иммунологии и вирусологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Ушаков В.Л. — к.б.н., доцент, руководитель отдела ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 имени Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы»; старший научный сотрудник Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт); ведущий научный сотрудник Института перспективных исследований мозга ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Крынский С.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и вирусологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Огурцов Д.П. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и вирусологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Хайлов Н.А. — к.м.н., старший научный сотрудник ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Ратушный А.Ю. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации «Институт медико-биологических проблем Российской академии наук», Москва, Россия

Чекулаева Е.И. — младший научный сотрудник ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Захарова Н.В. — к.м.н., руководитель лаборатории фундаментальных методов исследования ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 имени Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Костюк Г.П. — д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 имени Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Дидковский Н.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Authors:

Malashenkova I.K., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Molecular Immunology and Virology, National Research Center “Kurchatov Institute”; Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

Ushakov V.L., PhD (Biology), Associate Professor, Head of Department, N. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1; Senior Research Associate, National Research Nuclear University (Moscow Engineering Physics Institute); Leading Research Associate, Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Krynskiy S.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology and Virology, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

Ogurtsov D.P., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology and Virology, National Research Center “Kurchatov Institute”; Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

Khailov N.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Resource Center for Molecular and Cellular Biology, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

Ratushnyy A.Yu., PhD (Biology), Research Associate, Russian State Research Center “Institute of Biomedical Problems”, Moscow, Russian Federation

Chekulaeva E.I., Junior Research Associate, Resource Center for Molecular and Cellular Biology, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

Zakharova N.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Fundamental Research Methods, N. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russian Federation

Kostyuk G.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Physician, N. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russian Federation

Didkovsky N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Clinical Immunology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

АНАЛИЗ УРОВНЕЙ И КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ С ЛЕГКИМИ И УМЕРЕННЫМИ КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

Агарков Н.М.^{1,2}, Лев И.В.³, Ярошевич Е.А.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

³ Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Россия

Резюме. Иммунологические нарушения на системном уровне связаны с различными гериатрическими состояниями, в том числе с когнитивной дисфункцией, однако у пациентов с диабетической ретинопатией изменения интерлейкинового профиля крови изучены без учета степени тяжести когнитивных нарушений. Целью настоящего исследования являлся анализ уровней и корреляционных связей интерлейкинов в плазме крови у больных с диабетической ретинопатией с легкими и умеренными когнитивными нарушениями, среди 54 пациентов пожилого возраста с диабетической ретинопатией с легкими когнитивными нарушениями и 62 больных диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными расстройствами, проходивших стационарное обследование и лечение в 2021-2022 гг. в Тамбовском филиале МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» методом иммуноферментного анализа с использованием набора «Протеиновый контур» изучено содержание в плазме крови IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18. Выявление диабетической ретинопатии осуществлялось на основе комплексного офтальмологического обследования и с учетом клинических рекомендаций Общероссийской ассоциации врачей-офтальмологов «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический». Когнитивные функции оценивались по валидной шкале Mini-Mental State Examination. Показано, что у больных диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными нарушениями статистически значимо повышен уровень всех изученных провоспалительных интерлейкинов, чем у больных диабетической ретинопатией с легкими когнитивными нарушениями. В большей степени увеличилось содержание в плазме крови IL-6 до 24,4 \pm 2,1 пг/мл в сравнении с 5,1 \pm 0,8 пг/мл ($p < 0,001$) при легких когнитивных расстройствах. Развитие умеренных когнитивных нарушений у пациентов с диа-

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Nikolai M. Agarkov
South-West State University
300540, Russian Federation, Kursk, 50 let Oktyabrya str., 94.
Phone: +7 (910) 740-96-13
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.М. Агарков, И.В. Лев, Е.А. Ярошевич «Анализ уровней и корреляционных связей интерлейкинов крови у больных диабетической ретинопатией с легкими и умеренными когнитивными нарушениями» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1171-1178. doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2531

© Агарков Н.М. и соавт., 2022

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.M. Agarkov, I.V. Lev, E.A. Yaroshevich "Evaluation of blood interleukin levels and their correlations in the patients with diabetic retinopathy with mild and moderate cognitive impairment", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1171-1178. doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2531

© Agarkov N.M. et al., 2022

The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOB-2531

бетической ретинопатией сопровождалось также статистически значимым подъемом на системном уровне IL-8 до $36,7 \pm 3,5$ пг/мл против $10,5 \pm 2,3$ пг/мл при легких когнитивных нарушениях, IL-17 до $21,9 \pm 1,8$ пг/мл против $8,5 \pm 1,1$ пг/мл соответственно. Концентрация противовоспалительных интерлейкинов в плазме крови пациентов с диабетической ретинопатией с умеренной когнитивной дисфункцией достоверно уменьшилась – IL-4 до $2,1 \pm 0,3$ пг/мл против $3,4 \pm 0,5$ пг/мл при легкой степени ухудшения ментальности, IL-10 до $8,7 \pm 0,5$ пг/мл против $15,4 \pm 1,3$ пг/мл соответственно. Между уровнем системных интерлейкинов и умеренными когнитивными расстройствами больных диабетической ретинопатией выявлена большая сопряженность связей. С провоспалительными интерлейкинами и умеренными когнитивными нарушениями установлены обратные средние корреляции с IL-1 β ($r = -0,336$; $p = 0,021$), с IL-6 ($r = -0,584$; $p = 0,019$), с IL-8 ($r = -0,469$; $p = 0,006$), с IL-17 ($r = -0,348$; $p = 0,018$). Содержание IL-4 и IL-10 в плазме крови больных диабетической ретинопатией коррелирует с умеренными когнитивными нарушениями при достоверной величине $r = +0,407$ ($p = 0,016$) и $r = +0,359$ ($p = 0,008$) соответственно. При легких когнитивных нарушениях корреляции связи установлены с меньшим числом интерлейкинов, а именно с IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10 и представлены слабой связью, за исключением IL-6 (умеренная связь). Формирование умеренных когнитивных нарушений среди больных диабетической ретинопатией обусловлено повышением IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 и снижением IL-10.

Ключевые слова: интерлейкины крови, диабетическая ретинопатия, когнитивные нарушения, корреляционные связи, офтальмологические осложнения сахарного диабета, пожилой возраст

EVALUATION OF BLOOD INTERLEUKIN LEVELS AND THEIR CORRELATIONS IN THE PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY WITH MILD AND MODERATE COGNITIVE IMPAIRMENT

Agarkov N.M.^{a, b}, Lev I.V.^c, Yaroshevich E.A.^d

^a South-West State University, Kursk, Russian Federation

^b Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

^c S. Fedorov Center of Eye Microsurgery, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

^d N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. Systemic immunological disorders are associated with various geriatric conditions, including cognitive dysfunction. However, in patients with diabetic retinopathy, the changes of blood interleukin profile were studied without considering the severity of cognitive impairment. The aim of this study was to analyze blood plasma levels and intercorrelations of interleukins in the patients with diabetic retinopathy accompanied by mild and moderate cognitive impairment. Fifty-four elderly patients with diabetic retinopathy and mild cognitive impairment, and 62 patients with diabetic retinopathy and moderate cognitive disorders underwent inpatient examination and treatment at the Tambov branch of the S. Fedorov Center of Eye Microsurgery over 2021-2022. The interleukins contents in blood plasma were studied by enzyme immunoassay using the Protein Contour kit, including IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18. The diagnostics of diabetic retinopathy was based on comprehensive ophthalmological examination, according to the Clinical recommendations of the Society of the Russian Association of Ophthalmologists «Diabetes mellitus: diabetic retinopathy, diabetic macular edema». Cognitive functions were assessed according to a valid Mini- Mental-State-Examination scale. It has been shown that the patients with diabetic retinopathy and moderate cognitive impairment have a significantly increased level of all the studied proinflammatory interleukins, as compared to similar cohort with diabetic retinopathy accompanied by a mild cognitive impairment. In mild cognitive disorders, the content of IL-6 in blood plasma was higher (24.4 ± 2.1 pg/mL versus 5.1 ± 0.8 pg/mL, $p < 0.001$). Development of moderate cognitive impairment in the patients with diabetic retinopathy was also accompanied by a statistically significant increase of plasma IL-8 to 36.7 ± 3.5 pg/mL versus 10.5 ± 2.3 pg/mL with mild cognitive impairment; IL-17, to 21.9 ± 1.8 pg/mL versus 8.5 ± 1.1 pg/mL,

respectively. Concentrations of anti-inflammatory interleukins in blood plasma of the patients with diabetic retinopathy and moderate cognitive dysfunction were significantly decreased, i.e., IL-4 to 2.1 ± 0.3 pg/mL versus 3.4 ± 0.5 pg/mL in cases of mild mental deterioration; IL-10, to 8.7 ± 0.5 pg/mL versus 15.4 ± 1.3 pg/mL, respectively. A sufficient correlation was shown between the levels of systemic interleukins and moderate cognitive disorders in the patients with diabetic retinopathy. For the proinflammatory interleukins in cases of moderate cognitive impairment, an inverse correlations with IL-1 β ($r = -0.336$; $p = 0.021$), IL-6 ($r = -0.584$; $p = 0.019$), IL-8 ($r = -0.469$; $p = 0.006$), and with IL-17 ($r = -0.348$; $p = 0.018$) were shown. The content of IL-4 and IL-10 in blood plasma of the patients with diabetic retinopathy correlated with moderate cognitive impairment at a significant level of $r = +0.407$ ($p = 0.016$) and $r = +0.359$ ($p = 0.008$), respectively. In mild cognitive impairment, the correlations with fewer numbers of interleukins were revealed, i.e., IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10, and exhibit weaker connections, except of IL-6 (a moderate connection level). Development of moderate cognitive impairment among the patients with diabetic retinopathy may be caused by increase in IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, and a decrease in IL-10.

Keywords: blood interleukins, diabetic retinopathy, cognitive impairment, correlations, ophthalmological complications of diabetes mellitus, old age

Введение

Диабетическая ретинопатия представляет опасное для зрения осложнение и часто сочетается с развитием когнитивных нарушений [2, 5]. Однако связь между диабетической ретинопатией и когнитивными нарушениями неясна из-за неоднозначных результатов исследований и отсутствия долгосрочных данных [5]. Систематический обзор публикаций, сообщающих о взаимосвязи диабетической ретинопатии с когнитивной дисфункцией, показал высокий уровень связи между диабетической ретинопатией и когнитивными нарушениями, согласно которым отмечается почти трехкратное увеличение риска когнитивных нарушений среди больных диабетической ретинопатией по сравнению с пациентами без нее [4]. У мужчин с диабетической ретинопатией обнаружена ассоциация когнитивных нарушений с тяжестью вышеназванного офтальмологического заболевания. Сообщается также, что диабетическая ретинопатия более тесно связана с нарушениями когнитивных функций вербального обучения и текущей памятью.

Одним из общих механизмов и факторов риска формирования диабетической ретинопатии и когнитивной дисфункции называются иммунологические изменения на системном уровне, связанные с дисбалансом интерлейкинов [8, 12]. Микрососудистые и ишемические повреждения, обусловленные при диабетической ретинопатии гипергликемией и аномальными метаболическими путями, вызывают повышения концентрации различных воспалительных интерлейкинов, обнаруженных в избыточном количестве в слезе, стекловидном теле и сыворотке крови больных с тяжелой формой диабетической ретинопатии [8]. Однако изменение содержания интерлейкинов в крови анализируется, как правило, раздель-

но у пациентов с диабетической ретинопатией без когнитивной оценки или у пациентов с когнитивными нарушениями с различной соматической патологией. Одновременное изучение содержания интерлейкинов в крови у больных диабетической ретинопатией с когнитивной дисфункцией практически не осуществляется. Отсутствуют также исследования по сравнительной оценке системного интерлейкинового профиля у больных диабетической ретинопатией с различной степенью тяжести когнитивных нарушений. Поэтому **целью настоящего исследования** являлся анализ уровней и корреляционных связей интерлейкинов в плазме крови у больных с диабетической ретинопатией с легкими и умеренными когнитивными нарушениями.

Материалы и методы

В 2021-2022 гг. на базе Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» изучены изменения интерлейкинового статуса у 54 пациентов пожилого возраста с диабетической ретинопатией с легкими когнитивными нарушениями и у 62 больных пожилого возраста диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными расстройствами. Диагностика диабетической ретинопатии осуществлялась по результатам комплексного офтальмологического обследования и с учетом клинических рекомендаций Общероссийской ассоциации врачей-офтальмологов «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический» [1]. Оценка когнитивных функций выполнена посредством валидированной шкалы Mini-Mental State Examination (MMSE). Классификация когнитивных нарушений в соответствии с вышеназванной шкалой

проведена по величине баллов, набравших каждым пациентом с диабетической ретинопатией: 28,0–30,0 баллов – легкие когнитивные нарушения, 24,0–27,9 баллов – умеренные когнитивные нарушения.

Для изучения интерлейкинов в плазме крови забор последней осуществлялся в утренние часы, а затем иммуноферментным анализом с использованием набора «Протеиновый контур» изучалось содержание интерлейкинов в указанных ранее клинических группах: IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17 и IL-18.

Исследование осуществлялось с соблюдением общепринятых этических норм и принципов Хельсинкской декларации.

При статистическом анализе проводился расчет средних арифметических величин и их ошибок. Для выявления корреляционных связей применялись программа Statistica 10.0 и ее модуль «Корреляционный анализ» с расчетом коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты

Сравнивая содержание интерлейкинов крови у пожилых пациентов с диабетической ретино-

патией с легкими и умеренными когнитивными нарушениями, необходимо отметить существенность различий, достигающую во всех случаях статистически значимых различий в рассматриваемых группах (табл. 1). Обращает, прежде всего, внимание многократное увеличение уровня провоспалительного интерлейкина крови – IL-6 среди больных диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными нарушениями по сравнению с когортой пациентов такого же возраста, страдающих диабетической ретинопатией и легкими когнитивными нарушениями.

У пациентов пожилого возраста, страдающих диабетической ретинопатией и умеренными когнитивными нарушениями, диагностировано также выраженное статистически значимое повышение в плазме крови IL-8 по отношению к пациентам с диабетической ретинопатией и легкими нарушениями когнитивных функций. Обсуждаемые группы больных диабетической ретинопатией достоверно отличаются и по содержанию в плазме крови IL-1 β и IL-17, уровень которых выше в 2,1 раза и в 2,6 раза соответственно при наличии у обследованных умеренной ментальной дисфункции, чем при легкой степени.

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ С ЛЕГКИМИ И УМЕРЕННЫМИ КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ (M \pm m, пг/мл)

TABLE 1. BLOOD INTERLEUKIN LEVELS IN DIABETIC RETINOPATHY PATIENTS WITH MILD TO MODERATE COGNITIVE IMPAIRMENT (M \pm m, pg/mL)

Интерлейкины Interleukins	Пациенты с диабетической ретинопатией с легкими когнитивными нарушениями Patients with diabetic retinopathy with mild cognitive impairment	Пациенты с диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными нарушениями Patients with diabetic retinopathy with moderate cognitive impairment	p
IL-1 α	13,8 \pm 0,4	21,4 \pm 1,1	< 0,001
IL-1 β	32,6 \pm 1,8	68,2 \pm 2,4	< 0,001
IL-4	3,4 \pm 0,5	2,1 \pm 0,3	< 0,05
IL-5	3,0 \pm 0,3	4,6 \pm 0,4	< 0,05
IL-6	5,1 \pm 0,8	24,4 \pm 2,1	< 0,001
IL-7	5,3 \pm 0,2	7,2 \pm 0,4	< 0,01
IL-8	10,5 \pm 2,3	36,7 \pm 3,5	< 0,001
IL-9	8,2 \pm 0,6	11,6 \pm 0,8	< 0,01
IL-10	15,4 \pm 1,3	8,7 \pm 0,5	< 0,001
IL-12	6,2 \pm 0,6	10,6 \pm 0,9	< 0,01
IL-17	8,5 \pm 1,1	21,9 \pm 1,8	< 0,001
IL-18	58,3 \pm 2,2	67,7 \pm 2,6	< 0,05

Среди отличий системного интерлейкинового статуса пациентов 60-74 лет с диабетической ретинопатией и умеренной когнитивной дисфункцией следует назвать более высокий уровень IL-12, IL-1 β , IL-5 ($p < 0,001$). В меньшей степени, но статистически значимо, среди пациентов пожилого возраста, страдающих диабетической ретинопатией и умеренными когнитивными нарушениями, оказалась повышенной концентрация IL-7, IL-9 и IL-18, тогда как у больных диабетической ретинопатией и легкой степенью ментальной дисфункции их содержание было достоверно ниже.

Уровень противовоспалительных интерлейкинов крови, напротив, среди больных диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными нарушениями статистически значимо снижен в отличие от больных с аналогичной офтальмологической патологией, но с легкими нарушениями когнитивной функции. Так, уровень IL-4 в плазме крови у пациентов 60-74 лет, страдающих диабетической ретинопатией и умеренными нарушениями ментальности, снижен в 1,6 раза. Содержание другого изученного противовоспалительного IL-10 в плазме крови больных диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными нарушениями по сравнению с паци-

ентами с диабетической ретинопатией с легкой когнитивной дисфункцией уменьшилось в 1,8 раза. Различие между сравниваемыми группами обследованных в обоих случаях репрезентативно.

Выполненный корреляционный анализ связей между уровнем интерлейкинов в плазме крови с различной степенью когнитивных нарушений у пациентов 60-74 лет с диабетической ретинопатией выявил сопряженность большего количества системных интерлейкинов с умеренными когнитивными расстройствами (табл. 2). Среди пациентов с умеренными когнитивными нарушениями при диабетической ретинопатии установлено 7 статистически значимых корреляционных связей, тогда как у сравниваемой группы больных диабетической с легкими нарушениями ментальной функции – 4 статистически значимые корреляционные связи. При этом среди больных диабетической ретинопатией с умеренной когнитивной дисфункцией практически со всеми достоверно коррелируемыми провоспалительными интерлейкинами крови установлены обратные средние связи. Указанные корреляционные связи характерны для IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 с умеренными нарушениями когнитивной функции только с провоспалительными IL-12 обнаружена обратная слабая достоверная корр-

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ С УМЕРЕННЫМИ И ЛЕГКИМИ КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

TABLE 2. CORRELATIONS OF BLOOD INTERLEUKINS IN PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY WITH MODERATE AND MILD COGNITIVE IMPAIRMENT

Интерлейкины Interleukins	Пациенты с диабетической ретинопатией с легкими когнитивными нарушениями Patients with diabetic retinopathy with mild cognitive impairment		Пациенты с диабетической ретинопатией с умеренными когнитивными нарушениями Patients with diabetic retinopathy with moderate cognitive impairment	
	r	p	r	p
IL-1 α	-0,089	0,862	-0,125	0,428
IL-1 β	-0,0274	0,014	-0,336	0,021
IL-4	+0,185	0,213	+0,407	0,016
IL-5	-0,142	0,208	-0,138	0,389
IL-6	-0,361	0,023	-0,584	0,019
IL-7	-0,024	0,369	-0,089	0,548
IL-8	-0,285	0,014	-0,469	0,006
IL-9	-0,096	0,497	-0,148	0,294
IL-10	+0,278	0,013	+0,359	0,008
IL-12	-0,105	0,762	-0,264	0,022
IL-17	-0,164	0,094	-0,348	0,018
IL-18	-0,104	0,475	-0,069	0,672

ляция ($p = 0,022$). Между уровнем двух противовоспалительных системных интерлейкинов (IL-4 и IL-10) и умеренными когнитивными нарушениями у больных диабетической ретинопатией выявлены статистически значимые прямые корреляционные связи.

В группе пациентов с диабетической ретинопатией с легкими когнитивными нарушениями с анализируемыми интерлейкинами крови отмечалась достоверная обратная средняя корреляция только с IL-6. Слабые статистически значимые обратные связи у больных с диабетической ретинопатией с легкой когнитивной дисфункцией присущи IL-1 β и IL-8. Между исследованными противовоспалительными интерлейкинами крови только с уровнем IL-10 наблюдалась достоверная прямая слабая корреляционная связь. С остальными интерлейкинами корреляционные связи практически отсутствовали и не достигли достоверной значимости.

Обсуждение

Изучение взаимосвязей между выраженностью иммунологических изменений и когнитивными нарушениями у пациентов с диабетической ретинопатией представляет одну из актуальных проблем современной иммунологии [5, 6]. Несколько исследований анализировали связь диабетической ретинопатии с когнитивными нарушениями, показав противоречивые результаты [3]. Так, в недавнем метаанализе [3], включившем в себя 15 исследований из базы данных MEDLINE, отношение шансов ассоциации диабетической ретинопатии с когнитивными нарушениями составило 2,24 при 95% доверительном интервале 1,89-2,66. Однако в исследовании [9], выполненном на большой группе пациентов с диабетической ретинопатией, не обнаружено связи между диабетической ретинопатией и ухудшением когнитивных функций. Кроме того, между начальной стадией диабетической ретинопатии и когнитивной дисфункцией связи не установлено, как и не получено должного объяснения механизмов, лежащих в основе ассоциации диабетической ретинопатии со снижением ментальности [3]. Одним из механизмов развития когнитивных нарушений среди больных диабетической ретинопатией считается гиперпродукция провоспалительных интерлейкинов в условиях гипергликемии, негативно влияющих на сосуды сетчатки и головного мозга, имеющих общее происхождение и дренаж, что в конечном итоге может вызывать когнитивные нарушения [7, 12].

Показано участие системных IL-6, IL-10, TNF α , IL-12 и IL-17A в развитии когнитивной дисфункции при диабетической ретинопатии [8, 12]. В частности, среди 186 пациентов с легкими когнитивными изменениями установлено статистически значимое увеличение IL-6, IL-10 и снижение TNF α по сравнению с группой без когнитивных нарушений [12]. Более высокие уровни IL-6 в крови были связаны с ухудшением памяти и внимания. Аналогично, более высокие уровни IL-10 в крови связаны с высокой вероятностью развития легких когнитивных нарушений.

Полученные нами результаты соответствуют этим данным о выраженном повышении в плазме крови IL-6 у больных диабетической ретинопатией и прежде всего с умеренными, чем с легкими когнитивными нарушениями. Кроме того, нами установлена обратная средняя корреляционная связь между концентрацией IL-6 на системном уровне как с умеренными ($r = -0,584$), так и с легкими когнитивными нарушениями, что отличает настоящее исследование от предыдущих, базирующихся на метаанализе [3], в которых не были количественно подтверждены направление и сила связи.

В других исследованиях у пациентов, страдающих диабетической ретинопатией без оценки когнитивного статуса, установлено статистически значимое увеличение в крови IL-6 до $52,31 \pm 11,3$ пг/мл при диабетической ретинопатии по сравнению с $23,9 \pm 7,7$ пг/мл у людей без сахарного диабета 2-го типа и диабетической ретинопатии и IL-17A до $47,4 \pm 9,1$ пг/мл по сравнению с $28,8 \pm 7,7$ пг/мл соответственно [8]. Однако наблюдалось достоверное снижение концентрации IL-8 и IL-12. Изменение содержания IL-1 β , IL-2 и IL-4 не имело статистически значимых различий. Корреляционный анализ выявил положительную связь между уровнями IL-6 и TNF α и тяжестью диабетической ретинопатии.

Среди пациентов с когнитивной дисфункцией в ранее проведенных исследованиях обнаружены только ассоциации между воспалительными интерлейкинами или специфическими демографическими показателями, со снижением памяти и глобального познания [10]. Аналогичным образом предыдущие исследования показали различия в ассоциации воспалительных интерлейкинов и когнитивных функций в зависимости от пола, депрессии, сердечно-сосудистых заболеваний. Возможным объяснением отсутствия корреляции других интерлейкинов крови с когнитивным снижением может служить короткое время наблюдения за пациентами.

Однако выполненное нами сравнительное исследование изменений уровня и корреляционных связей системных интерлейкинов у больных диабетической ретинопатией с легкими и умеренными когнитивными нарушениями впервые показало более существенное повышение провоспалительных интерлейкинов и снижение противовоспалительных интерлейкинов при умеренных когнитивных нарушениях, более выраженную корреляцию и с большим количеством интерлейкинов крови, чем при легкой степени когнитивной дисфункции.

Заключение

На основании вышепредставленных результатов можно утверждать, что развитие умерен-

ных когнитивных нарушений среди пожилых больных диабетической ретинопатией сопровождается более существенными изменениями системного интерлейкинового профиля, чем у больных с таким же заболеванием и легкой когнитивной дисфункцией. Это свидетельствует о том, что более выраженное повышение провоспалительных интерлейкинов и снижение противовоспалительных интерлейкинов в плазме крови способствует формированию умеренных когнитивных нарушений. Последние достоверно коррелирует с большим числом системных интерлейкинов и находятся в обратной средней связи с IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 и прямой средней связи с IL-4 и IL-10.

Список литературы / References

1. Астахов Ю.С., Нероев В.В., Шестакова М.В., Зайцева О.В., Охочимская Т.Д., Рябина М.В., Шадричев Ф.Е., Григорьева Н.Н., Липатов Д.В., Кононенко И.В. Клинические рекомендации «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический». М.: Общероссийская общественная организация «Ассоциация врачей-офтальмологов», 2020. 52 с. [Astakhov Yu.S., Neroev V.V., Shestakova M.V., Zaitseva O.V., Okhotsimskaya T.D., Ryabina M.V., Shadrichev F.E., Grigorieva N.N., Lipatov D.V., Kononenko I.V. Clinical recommendations "Diabetes mellitus: diabetic retinopathy, diabetic macular edema"]. Moscow: All-Russian public organization "Association of Ophthalmologists", 2020. 52 p.
2. Фабрикантов О.Л., Агарков Н.М., Лев И.В., Гурко Т.С., Яблоков М.М., Москалева Е.О., Москалев А.А. Аллостатическая нагрузка как способ объективизации возрастной жизнеспособности пациентов с офтальмопатологией // Научные результаты биомедицинских исследований, 2021. Т. 7, № 4. С. 451-460. [Fabrikantov O.L., Agarkov N.M., Lev I.V., Gurko T.S., Yablokov M.M., Moskaleva E.O., Moskaev A.A. Allostatic load as a way to objectify the age viability of patients with ophthalmopathology. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine*, 2021, Vol. 7, no. 4, pp. 451-460. (In Russ.)].
3. Cheng D., Zhao X., Yang S., Wang G., Ning G. Association between diabetic retinopathy and cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Front. Aging Neurosci.*, 2021, Vol. 13, 632911. doi: 10.3389/fnagi.2021.692911.
4. Crosby-Nwaobi R.R., Sivaprasad S., Amiel S., Forbes A. The relationship between diabetic retinopathy and cognitive impairment. *Diabetes Care*, 2013, Vol. 36, no. 10, pp. 3177-3186.
5. Gupta P., Gan A.T., Man R.E., Fenwick E.K., Sabanayagam C., Mitchell P., Cheung C.Y., Cheung N., Wong T.Y., Cheng C.Y., Lamoureux E.L. Association between diabetic retinopathy and incident cognitive impairment. *Br. J. Ophthalmol.*, 2019, Vol. 103, no. 11, pp. 1605-1609.
6. Lu X., Gong W., Wen Z., Hu L., Peng Z., Zha Y. Correlation between diabetic cognitive impairment and diabetic retinopathy in patients with T2DM by ¹H-MRS. *Front. Neurol.*, 2019, Vol. 10, 1068. doi: 10.3389/fneur.2019.01068.
7. Moss H.E. Retinal vascular changes are a marker for cerebral vascular diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 2015, Vol. 15, no. 7, 40. doi: 10.1007/s11910-015-0561-1.
8. Quevedo-Martinez J.U., Garfias Y., Jimenez J., Garcia O., Venegas D., Bautista V.M. Pro-inflammatory cytokine profile is present in the serum of Mexican patients with different stages of diabetic retinopathy secondary to type 2 diabetes. *BMJ Open Ophthalmol.*, 2021, Vol. 6, no. 1, e000717. doi: 10.1136/bmjophth-2021-000717.
9. Rodill L.G., Exalto L.G., Gilsanz P., Biessels G.J., Quesenberry C.P., Whitmer R.A. Diabetic retinopathy and dementia in type 1 Diabetes. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 2018, Vol. 32, no. 2, pp. 125-130.
10. Schram M.T., Euser S.M., Craen A.J., Witteman J.C., Frolich M., Hofman A., Jolles J., Breteler M.B., Westendorp R.G. Systemic markers of inflammation and cognitive decline in old age. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 2007, Vol. 55, no. 5, pp. 708-716.

11. Urbančić M., Petrović D., Živin A.M., Koroseč P., Fležar M., Petrović M. Correlations between vitreous cytokine levels and inflammatory cells in fibrovascular membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Mol. Sci.*, 2020, no. 26, pp. 472-482.
12. Wennberg A.M, Hagen C.E., Machulda M.M., Knopman D.S., Petersen R.C., Mielke M.M. The Cross-Sectional and Longitudinal Associations between IL-6, IL-10, and TNF α and cognitive outcomes in the Mayo Clinic Study of Aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2019, Vol. 74, no. 8, pp. 1289-1295.

Авторы:

Агарков Н.М. — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Лев И.В. — к.м.н., заведующая I офтальмологическим отделением Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Ярошевич Е.А. — ассистент кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Россия

Authors:

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, South-West State University, Kursk; Senior Research Associate, Laboratory "Problems of Aging", Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation

Lev I.V., PhD (Medicine), Ophthalmologist, Head, First Ophthalmological Department, S. Fedorov Center of Eye Microsurgery, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Yaroshevich E.A., Assistant Professor, Department of Ophthalmology, Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 29.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 29.07.2022

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К АЛЛЕРГЕНАМ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ В ТЕСТЕ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Бычкова Н.В.^{1,2}, Крутикова И.В.¹, Чернышова А.В.³,
Калинина Н.М.^{1,2}

¹ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Респираторная аллергия занимает значимое место в структуре аллергических заболеваний. Схожие клинические проявления возникают у sensibilized пациентов в ответ на различные аэроаллергены. Соответственно, для выявления причинно-значимого аллергена необходимо проведение аллергологического обследования с привлечением тестов *in vivo* и *in vitro*. Основным лабораторным методом оценки sensibilization к аэроаллергенам является оценка специфических иммуноглобулинов E (sIgE), но не всегда клинические проявления можно подтвердить в этом тесте. Целью настоящей работы стало оценить возможности теста активации базофилов (БАТ) методом проточной цитометрии для подтверждения sensibilization к аллергенам клещей домашней пыли. БАТ с аллергенами клещей рода *Dermatofagoides* был проведен 130 пациентам (33 человека с бытовой и 97 лиц с полисенсибилизацией) ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, 34 волонтерам и 10 пациентам с аллергией к клещам домашней пыли, подтвержденной результатами кожного тестирования. Наличие sensibilization оценивали двумя наборами реактивов Allergenicity kit и BD FastImmune. Определяли концентрацию общего IgE, sIgE к клещам домашней пыли, а также эозинофильно-катионного белка. Специфичность метода для определения sensibilization к клещам домашней пыли в тесте активации базофилов с использованием Allergenicity kit составила 94%. У пациентов с бытовой sensibilization чувствительность составила 88%, что сопоставимо с результатами кожного тестирования, имеющимися в литературе. Выявлена абсолютная корреляция положительных результатов кожного тестирования и БАТ. У пациентов с бытовой sensibilization sIgE выше 0,35 МЕ/мл определены в

Адрес для переписки:

Бычкова Наталья Владимировна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России
198216, Россия, Санкт-Петербург, Ленинский пр., 129,
корп. 5, кв. 66.
Тел.: 8 (921) 320-12-62.
E-mail: BNV19692007@yandex.ru

Address for correspondence:

Nataliya V. Bychkova
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation
Medicine
198216, Russian Federation, St. Petersburg, Leninskiy ave.,
129, bldg 5, apt 66.
Phone: +7 (921) 320-12-62.
E-mail: BNV19692007@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.В. Бычкова, И.В. Крутикова, А.В. Чернышова,
Н.М. Калинина «Клиническая значимость выявления
сенсibilization к аллергенам клещей домашней пыли
в тесте активации базофилов методом проточной
цитометрии» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 6. С. 1179-1188.
doi: 10.15789/1563-0625-CSO-2541

© Бычкова Н.В. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Bychkova, I.V. Krutikova, A.V. Chernyshova,
N.M. Kalinina "Clinical significance of sensitization to house
dust mite allergens using flow cytometry-based basophil
activation test", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1179-1188.
doi: 10.15789/1563-0625-CSO-2541

© Bychkova N.V. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CSO-2541

39% случаев. Показана прямая зависимость между индексами активации базофилов в ответ на аллергены клещей и концентрацией общего иммуноглобулина E и sIgE. Выявлена высокая корреляционная зависимость между результатами определения сенсibilизации к клещам рода *Dermatofagoides* с использованием двух различных наборов реактивов для оценки активации базофилов. Показано, что применение блокаторов H1-гистаминовых рецепторов не влияло на результаты БАТ. Наблюдалось снижение чувствительности метода для подтверждения сенсibilизации к аэроаллергенам на фоне приема глюкокортикостероидных препаратов. Ввиду доказанной высокой клинической значимости теста активации базофилов для диагностики сенсibilизации к ингаляционным аллергенам в перспективе необходимо дополнить спектр разрешенных в отечественных Клинических рекомендациях методов для подтверждения сенсibilизации у пациентов с аллергическим ринитом и бронхиальной астмой этим тестом, что будет способствовать улучшению диагностики причинно-значимого аллергена и, соответственно, назначению корректной терапии.

Ключевые слова: тест активации базофилов, аллергены клещей домашней пыли, специфические IgE, кожное тестирование

CLINICAL SIGNIFICANCE OF SENSITIZATION TO HOUSE DUST MITE ALLERGENS USING FLOW CYTOMETRY-BASED BASOPHIL ACTIVATION TEST

Bychkova N.V.^{a, b}, Krutikova I.V.^a, Chernyshova A.V.^c, Kalinina N.M.^{a, b}

^a A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Respiratory allergy takes a significant place among allergic diseases. Similar clinical manifestations occur in sensitized patients in response to various airborne allergens. Accordingly, the allergen testing by means of *in vivo* and *in vitro* techniques is necessary to identify a causally significant allergen. The main laboratory assay to estimate sensitization to the airborne allergens is based on detection of specific immunoglobulin E (sIgE). However, clinical manifestations cannot be always confirmed by this test. The aim of this work was to evaluate the potential of basophil activation test (BAT) using flow cytometry, in order to confirm sensitization to house dust mite allergens. The BAT was carried out with allergens from *Dermatofagoides* in 34 volunteers, 130 patients were examined at the Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine (33 people with household and 97 people with polysensitization), and 10 patients with allergy to house dust mites confirmed by skin testing. The sensitization was assessed using two laboratory kits (Allergenicity and BD FastImmune). The total IgE and sIgE to house dust mites, as well as concentrations of eosinophilic cationic protein, were determined. Specificity of the BAT with Allergenicity kit for the house dust mites was 94%. The sensitivity was 88% in the patients with household sensitization, thus being comparable with skin testing results available from the literature. An absolute correlation was found between positive results of skin testing and the BAT. In patients with household sensitization, sIgE levels > 0.35 UA/mL were detected in 39% of cases. A positive correlation was shown between the indices of basophil activation in response to testing allergens, and total immunoglobulin E and sIgE concentrations. High degree of correlation was found between the results of *Dermatofagoides* sensitization testing with both BAT kits. It was shown that the use of H1 histamine receptor blockers had no effect on BAT results. A decrease in sensitivity assay for airborne allergens was revealed upon therapy with glucocorticosteroids. Due to the proven clinical significance of the basophil activation test for diagnosing sensitization to inhaled allergens, one may require to supplement the range of approved assays in Russian Clinical Guidelines with BAT testing to prove sensitization in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma, thus contributing to better diagnosis of causally significant allergens and, accordingly, administration of proper therapy.

Keywords: basophil activation test (BAT), dust mite allergens, specific IgE, skin tests

Введение

В настоящее время повсеместно наблюдается повышение встречаемости аллергической патологии. Респираторная аллергия занимает значимое место в структуре этих заболеваний,

например, аллергическим ринитом страдает от 10 до 40% населения [16]. Одними из самых распространенных ингаляционных аллергенов являются клещи домашней пыли. Это отмечают как отечественные [3], так и зарубежные авторы [21].

Клинические проявления аллергии к ингаляционным аллергенам разнообразны и могут проявляться в виде ринита, конъюнктивита, дерматита, а также симптомов бронхиальной астмы. Следует отметить, что схожие проявления возникают у сенсibilизированных пациентов в ответ на различные аэроаллергены. Таким образом, для выявления причинно-значимого аллергена необходимо проведение аллергологического обследования с привлечением тестов *in vivo* и *in vitro*. Корректная диагностика сенсibilизации будет способствовать адекватной терапии с учетом выявленного спектра аллергенов [5].

Существует устойчивая тенденция расширения спектра сенсibilизации со временем с утяжелением симптоматики [2]. Для оказания своевременной и квалифицированной медицинской помощи необходимо раннее выявление причинно-значимого аллергена и проведение патогенетического лечения, что сможет предотвратить развитие атопического марша.

Согласно Клиническим рекомендациям по диагностике и лечению аллергического ринита [6], конъюнктивита [7] и бронхиальной астмы [10] для выявления причинно-значимого аллергена и направления пациента на аллерген-специфическую иммунотерапию (АСИТ) необходимо использовать кожное тестирование с аллергеном либо оценку результатов специфических иммуноглобулинов E. Известны противопоказания к проведению *prick*-тестов, в некоторых случаях пациенты отказываются от их применения, а результаты лабораторных тестов для выявления специфических IgE не всегда показательны, что, возможно, обусловлено местным синтезом этих иммуноглобулинов [12].

Целью настоящей работы стало оценить возможности теста активации базофилов методом проточной цитометрии для подтверждения сенсibilизации к аллергенам клещей домашней пыли.

Материалы и методы

В комплексное обследование включены 130 пациентов, проходивших обследование и лечение во ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС РФ с жалобами на слезотечение, зуд век, кашель, дыхательный дискомфорт, а также заложенность носа, затруднение носового дыхания, чихание, насморк. Среди них было 37 мужчин и 93 женщины в возрасте от 18 до 71 года ($40,9 \pm 0,7$ г.). Пациенты с риноконъюнктивальными симптомами и/или патологией верхних и средних дыхательных путей были разделены на 2 группы. 1-ю группу составили пациенты с бытовой сенсibilизацией ($n = 33$), 2-ю группу – пациенты с полисенсibilизацией к бытовому, пищевому, эпидермальным,

пылевым аллергенам в различных сочетаниях ($n = 97$). Осуществление кожного тестирования было невозможно по разным причинам. Пациентам проводили определение в сыворотке крови концентрации общего иммуноглобулина E, специфических иммуноглобулинов E (sIgE) к различным аллергенам с учетом анамнеза, в том числе к клещам домашней пыли (КДП) *D. pteronissinus* и *D. farinae*, эозинофильно-катионного белка (Immulate 2000 XPI, Siemens). Всем обследованным осуществляли постановку теста активации базофилов (БАТ) с аллергенами КДП (Siemens) в разведении 1:25 в течение не более 2 часов от момента забора крови в вакутейнеры с гепарином лития с использованием набора реактивов Allergenicity kit (Beckman Coulter, США) методом проточной цитометрии (FC500, Beckman Coulter, США). Популяцию базофилов выявляли в многоцветном протоколе с использованием моноклональных антител к CD3/CD294/CD203c, а их активацию оценивали на основании возрастания экспрессии CD203c после стимуляции аллергенами *in vitro* в соответствии с инструкцией к коммерческой тест-системе Allergenicity kit, как подробно описано ранее [1]. Наличие/отсутствие сенсibilизации к аллергенам КДП в БАТ определяли на основании индекса активации базофилов с пороговым значением 1,1. Индекс активации базофилов – отношение количества активированных базофилов в пробе с аллергеном к количеству этих клеток в пробе с буферным раствором. 32 пациентам сенсibilизация к клещам домашней пыли была оценена также с применением реактивов BD FastImmune (Becton Dickinson). При их использовании идентификацию базофилов осуществляли в многоцветном протоколе с применением моноклональных антител к CD123/HLA DR/CD63, а их активацию оценивали на основании экспрессии CD63 после стимуляции *in vitro*. Среди лиц с сенсibilизацией, а чаще в группе сравнения, встречались пациенты с полным отсутствием спонтанно активированных базофилов. Ввиду выявленных особенностей экспрессии CD63 использовать индекс активации базофилов для оценки позитивности теста не представилось возможным. В качестве порогового значения для оценки позитивности теста при применении реактивов BD FastImmune вместо индекса активации было использовано относительное количество активированных базофилов в пробе с аллергеном более 1,4%.

Основная группа сравнения ($n = 34$) состояла из условно здоровых лиц того же возраста с отсутствием острых воспалительных процессов любой этиологии.

Вторая группа сравнения состояла из 10 пациентов с аллергией к клещам домашней пыли, подтвержденной положительными результатами кожного тестирования с аллергеном *D. pteronissinus* (АО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия). Среди них был 1 мужчина и 9 женщин в возрасте от 21 года до 54 лет ($35,7 \pm 3,8$ г.). Результаты кожного тестирования выражали в плюсах от 1 до 4, отрицательным контролем был стандартный тест-контроль, в качестве положительного контроля использовали раствор гистамина в разведении 1:1000.

Пакет Statistica 12.0 (StatSoft, США) с определением описательных статистик (средних значений, стандартной ошибки) использовали для статистической обработки результатов. Значимость различий в группах оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни для независимых переменных. Частотный анализ проводили с использованием четырехпольных таблиц сопряженности на основании критерия χ^2 Пирсона. Для выявления связи между количественными признаками использовали непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Статистически значимыми различия сравниваемых показателей считали при $p < 0,05$.

Результаты

Специфические IgE к КДП у всех лиц основной группы сравнения в нашем исследовании были менее 0,1 МЕ/мл. Наличие сенсibilизации к клещам домашней пыли в тесте активации базофилов было определено у 1 человека (2,9%) из основной группы сравнения. Ввиду отсутствия явных клинических проявлений аллергии данный результат можно трактовать как латентную сенсibilизацию. Специфичность метода клеточного анализа для определения сенсibilизации

к клещам домашней пыли в тесте активации базофилов составила 94%.

Среди 10 человек второй группы сравнения у 3 лиц при проведении кожного тестирования результат был оценен на один плюс, у 6 – на два и у 1 – на четыре плюса. У всех 10 пациентов с положительными кожными пробами на аллерген *D. pteronissinus* была выявлена сенсibilизация к этому аллергену в тесте активации базофилов. Индекс активации базофилов у 3 человек был достаточно низкий и находился в интервале 1,2-2, в среднем $1,4 \pm 0,1$, у остальных 7 пациентов составил от 2 до 56, в среднем $27,8 \pm 8,2$. Значимой корреляции между интенсивностью кожной реакции на аллерген и индексом активации базофилов *in vitro* не наблюдалось.

Согласно нашим данным, сенсibilизация к аллергенам клещей домашней пыли не зависела от половой и возрастной принадлежности пациентов. При проведении корреляционного анализа по Спирмену не было выявлено значимой связи между наличием сенсibilизации к аллергенам клещей домашней пыли, а также возрастом и полом ($R = 0,07$, $R = 0,12$ соответственно).

Пациенты с полисенсibilизацией отличались значимо более высокой концентрацией общего иммуноглобулина E и имели тенденцию к повышению уровня эозинофильно-катионного белка (табл. 1), что сочеталось со значимым увеличением частоты эозинофилии в этой группе (46% и 16% соответственно, $p < 0,01$, критерий χ^2).

В нашем исследовании у пациентов с бытовой сенсibilизацией причинно-значимый аллерген клещей рода *Dermatofagoides* был подтвержден в тесте активации базофилов с использованием Allergenicity kit у 29 человек, чувствительность метода составила 88%. В то же время в этой группе больных частота выявления специфических IgE к

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ОБЩЕГО И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ E К АЛЛЕРГЕНАМ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ (МЕ/мл) И ЭОЗИНОФИЛЬНО-КАТИОННОГО БЕЛКА (пкг/мл)

TABLE 1. CONCENTRATION OF TOTAL AND SPECIFIC IMMUNOGLOBULINS E TO HOUSE DUST MITE ALLERGENS (IU/mL) AND EOSINOPHILIC CATIONIC PROTEIN (pcg/mL)

Параметры Parameters	Пациенты с бытовой сенсibilизацией Patients with household sensitization n = 33	Пациенты с полисенсibilизацией Patients with polysensitization n = 97
IgE	237±95*	367±54*
sIgE (<i>D. pteronissinus</i>)	0,72±0,30	0,31±0,10
sIgE (<i>D. farina</i>)	0,26±0,07	0,32±0,04
ЭКБ ECP	32,3±3,8	56,2±22,2

Примечание. * – $p < 0,05$.

Note. *, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ СЕНСIBILИЗАЦИЯ *IN VITRO* К АЛЛЕРГЕНАМ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ В ТЕСТЕ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ (ALLERGENICITY KIT) И ПО ДАННЫМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE, n (%)

TABLE 2. FREQUENCY OF DETECTION OF *IN VITRO* SENSITIZATION TO HOUSE DUST MITE ALLERGENS IN THE BASOPHIL ACTIVATION TEST (ALLERGENICITY KIT) AND ACCORDING TO THE DETERMINATION OF SPECIFIC IgE, n (%)

Метод Method	Бытовая сенсibilизация Household sensitization n = 33	Полисенсibilизация Polysensitization n = 97
Тест активации базофилов Basophil activation test	29 (88)*	65 (67)**
Определение sIgE Definition sIgE	13 (39)*	40 (41)**

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,05$.

Note. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.05$.

КДП была статистически значимо меньше – 39% (табл. 2). В группе пациентов с полисенсibilизацией в 67% случаев был определен повышенный индекс активации базофилов на клещевые аллергены, у 40 пациентов (41%) были выявлены специфические IgE к КДП (табл. 2). При доказанной сенсibilизации к различным эпидермальным и пылевым аллергенам у этих больных достаточно часто была выявлена и сенсibilизация к бытовым аллергенам.

В тесте активации базофилов у пациентов было выявлено сочетание сенсibilизации к аллергенам *D. pteronissinus* и *D. farinae* ($R = 0,75$ по Спирмену, $p < 0,05$).

На основании корреляционного анализа показана прямая зависимость между индексами активации базофилов в ответ на аллерген *D. pteronissinus* и *D. farinae* и концентрацией общего иммуноглобулина E ($R = 0,36$ и $R = 0,39$, $p < 0,05$ соответственно), а также концентрацией sIgE к КДП ($R = 0,47$ и $R = 0,54$, $p < 0,05$ соответственно).

На рисунке 1 сопоставлены данные выявления сенсibilизации к клещам домашней пыли в обеих группах пациентов, полученные двумя методами. Совпадения данных наблюдались в 42% случаев при бытовой (рис. 1А) и в 69% при полисенсibilизации (рис. 1Б). Положительные результаты совпадали в 36-40% случаев. При полисенсibilизации большая частота совпадений объяснялась более высоким количеством дважды отрицательных результатов – 29% против 6% при бытовой сенсibilизации. При наличии бытовой сенсibilизации подтвердить аллерген можно было только в тесте активации базофилов в половине случаев (52%), при полисенсibilизации – у трети пациентов (29%). У 2 пациентов при обоих типах сенсibilизации при повышенном уровне специфических IgE к КДП индекс активации базофилов на аллергены был в норме.

У 32 человек проведено исследование по сопоставлению данных о клещевой сенсibilизации, полученных с помощью реактивов Allergenicity kit (Beckman-Coulter) и BD FastImmune (Beckton Dickinson).

Несмотря на использование различных стратегий гейтирования популяции базофилов и активационных маркеров выявлена высокая статистически значимая корреляционная зависимость между определением сенсibilизации к клещам рода *Dermatofagoides*, полученных обоими методами ($R = 0,71$ для *D. pteronissinus*, $R = 0,78$ для *D. farinae*, $p < 0,05$). Совпадение результатов наблюдалось в 63% случаев – в 47% результаты были положительными, в 16% – отрицательными. Практически у трети пациентов (28%) причинно-значимый аллерген был подтвержден только в тесте активации базофилов при использовании тест-системы Allergenicity kit. В 3 случаях (9%) сенсibilизация к КДП определена только в тесте BD FastImmune. Несовпадение результатов, как правило, наблюдали при невысокой степени активации базофилов – $2,2 \pm 0,5$ против $20,1 \pm 3,1$ у пациентов с подтвержденной сенсibilизацией обоими тест-системами.

Среди всех обследованных пациентов у 60 человек была необходимость в использовании интраназальных и комбинированных ингаляционных глюкокортикостероидных препаратов (мометазона фуруат, флутиказона фуруат, будесонид, бекламетазон, флутиказон и др.). Частота подтверждения сенсibilизации к пылевым клещам в тесте активации базофилов в группе пациентов с полисенсibilизацией, не применявших на момент обследования глюкокортикостероидные препараты, в нашем исследовании была значимо выше, чем в другой группе (78% и 57% $p < 0,05$, критерий χ^2). У пациентов с бытовой сенсibilизацией, не использовавших глюкокортикостероиды, в 100% случаев был подтвержден

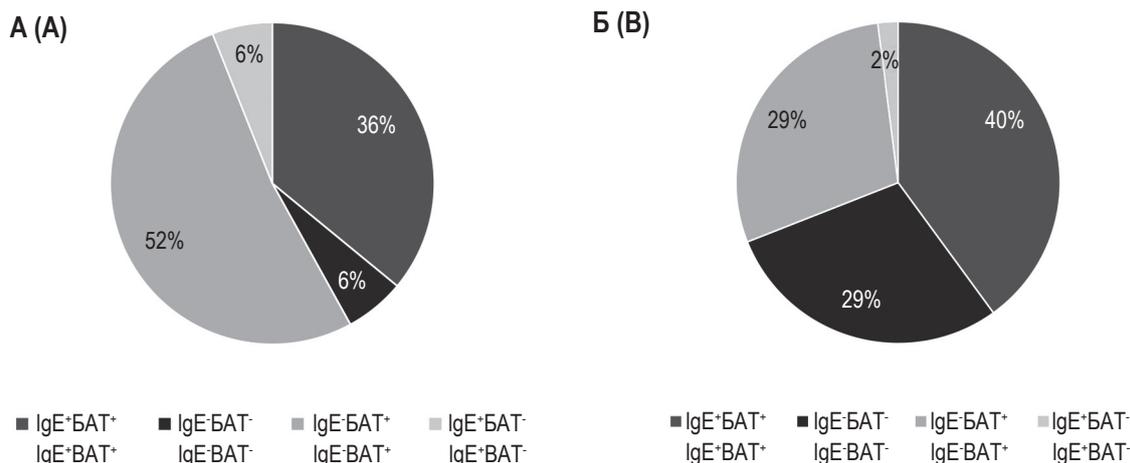


Рисунок 1. Сопоставление данных подтверждения сенсibilизации к клещам домашней пыли с использованием теста активации базофилов (БАТ) и определения специфических IgE в группе пациентов с бытовой сенсibilизацией (А) и полисенсibilизацией (Б)

Figure 1. Comparison of data on confirmation of sensitization to house dust mites using the basophil activation test (BAT) and the determination of specific IgE in the group of patients with household sensitization (A) and polysensitization (B)

клещевой аллерген против 72% у пациентов, находящихся на терапии ($p < 0,05$, критерий χ^2).

44 обследованных пациента постоянно использовали блокаторы H1-гистаминовых рецепторов (лоратадин, дезлоратадин, цетиризин, левоцетиризин, эбастин, биластин др.). В отличие от приема глюкокортикостероидных препаратов использование антигистаминных средств не оказало выраженного негативного влияния на чувствительность выявления сенсibilизации к КДП. Частота подтверждения сенсibilизации к пылевым клещам у пациентов с полисенсibilизацией в тесте активации базофилов в зависимости от приема блокаторов H1-гистаминовых рецепторов была сопоставима – 67% и 70%. Пациенты с бытовой сенсibilизацией в отсутствие приема препаратов показали несколько более высокую частоту сенсibilизации – 91% по сравнению с 82% на фоне использования антигистаминных средств, статистически значимой разницы не выявлено.

У сенсibilизированных к КДП пациентов в среднем индексы активации базофилов на аллергены *D. pteronissinus* и *D. farinae* были сопоставимы, а именно $14,2 \pm 1,1$ и $13,6 \pm 1,1$ соответственно.

Индекс активации базофилов у пациентов со средней тяжестью аллергического ринита и/или бронхиальной астмы был выше по сравнению с группой пациентов с легким течением заболевания – $17,3 \pm 1,1$ и $12,7 \pm 1,1$ соответственно, $p < 0,05$.

Выявлена тенденция ($p = 0,05$) увеличения индекса активации базофилов у пациентов с полисенсibilизацией по сравнению с больными

из группы с бытовой сенсibilизацией ($15,8 \pm 1,1$ и $10,8 \pm 1,1$ соответственно).

После комплексного обследования и подтверждения причинно-значимого аллергена 50 человек были направлены на проведение аллергенспецифической терапии с аллергенами клещей домашней пыли. У 32 пациентов причинно-значимый клещевой аллерген был подтвержден обоими методами, а у 18 больных определение сенсibilизации было возможно исключительно в тесте активации базофилов, специфические IgE к пылевым клещам были менее 0,1 МЕ/мл.

К настоящему времени 5 пациентов прошли полный курс АСИТ с клещевыми аллергенами, выявлена высокая клиническая эффективность терапии.

Обсуждение

Тест активации базофилов для подтверждения сенсibilизации к ингаляционным клещевым аллергенам показал как высокую специфичность – 94%, так и достаточно высокую чувствительность. У пациентов с бытовой сенсibilизацией этот показатель составил 88%, а в отсутствие приема глюкокортикостероидных препаратов у всех 15 человек была подтверждена сенсibilизация к аллергенам пылевых клещей. В то же время подтвердить аллерген с помощью оценки специфических IgE к КДП было возможно лишь в 39% случаев.

Показана высокая значимая корреляционная зависимость между результатами, полученными с помощью наборов Allergenicity kit и BD FastImmune, которые используют разные марке-

ры для идентификации и оценки активации базофилов. Наши данные согласуются с результатами исследования Eberlein-K nig В. и соавт. [13], которые на модели инсектной аллергии показали, что CD203c, используемый в наборе Allergenicity kit, обладает более высокой чувствительностью и вызывает больший антиген-зависимый ответ базофилов, чем CD63, хотя CD63 обладает более высокой специфичностью. В целом паттерн экспрессии этих маркеров сходен [15] и, таким образом, результаты тестов с использованием этих маркеров сопоставимы. Выявленная корреляционная зависимость свидетельствует об общих методологических подходах к использованию теста активации базофилов для подтверждения сенсibilизации к аэроаллергенам независимо от частных методических особенностей вариантов тест-систем.

Наши результаты о чувствительности и специфичности теста активации базофилов сопоставимы с полученными несколькими группами зарубежных исследователей. В исследовании Gomes R.M. и соавт. [14] у пациентов с местным аллергическим ринитом для определения сенсibilизации к пылевым клещам чувствительность метода составила 85% и специфичность 93%. Несколько большая чувствительность (90%) и меньшая специфичность (73%) БАТ была продемонстрирована Ogulur I. и соавт. для тех же аллергенов у детей с аллергическим ринитом [18]. Li Y. и соавт. [17] показали, что для теста активации базофилов определена большая площадь под кривой AUC, чем для специфических IgE к КДП при значимой прямой корреляционной зависимости между этими лабораторными тестами у детей с ринитом и астмой. В работе Testera-Montes A. с соавт. [23] при местном аллергическом рините тест активации базофилов был позитивен у 33% пациентов, в то время как при классическом аллергическом рините с системными проявлениями атопии все пациенты имели положительный результат в БАТ. В то же время в работе Ren H.L. и соавт. [19] указано, что чувствительность подтверждения сенсibilизации по выявлению специфических IgE к КДП была выше, чем у теста активации базофилов, что противоречит нашим и большинству литературных данных.

Наше исследование показало, что метод клеточного анализа с целью лабораторной диагностики сенсibilизации к аэроаллергенам обладает лучшими возможностями для более точного подтверждения причинно-значимого аллергена, чем определение sIgE. Высокая чувствительность подтверждения сенсibilизации в тесте активации базофилов сопоставима с результатами кожного тестирования. В исследовании Traiyan S. и соавт. [24] в группе детей с ринитом чувствительность prick-теста с аллергенами клещей домаш-

ней пыли составила 89,6% при специфичности 88%. Для подтверждения сенсibilизации к пылевым клещам чувствительность модифицированного эпикутанного patch-теста составила 93,85% при специфичности 94,87% [20].

В нашем исследовании была абсолютная корреляция положительных результатов кожного тестирования и теста активации базофилов. Известно много противопоказаний к проведению кожных проб [5]. Это исследование не проводят при обострении аллергических и инфекционных заболеваний, декомпенсации психических болезней, а также при наличии в анамнезе анафилактического шока. Известны относительные противопоказаниями, к которым относятся терапия антигистаминными и глюкокортикостероидами, ранний и пожилой возраст, выраженные изменения кожи и др. Для пациентов с неуверительными результатами кожного тестирования, при невозможности их проведения, с наличием противопоказаний корректной альтернативой может стать определение сенсibilизации в тесте активации базофилов ввиду выявленной высокой чувствительности и специфичности метода.

В нашем исследовании показано, что высокий индекс активации базофилов на аллергены клещей домашней пыли коррелировал с более выраженной тяжестью аллергической патологии, что предполагает его использование для комплексной оценки состояния пациента.

Показано, что применение блокаторов H1-гистаминовых рецепторов не влияло на результаты теста, в то же время наблюдалось снижение чувствительности теста активации базофилов для подтверждения сенсibilизации к аэроаллергенам на фоне приема глюкокортикостероидных препаратов. Схожие данные об отсутствии влияния антигистаминных препаратов на результаты теста были получены Sturm G.J. и соавт. [22] на небольшой группе пациентов до и после приема дезлоратадина. Эти же авторы в эксперименте выявили снижение активации базофилов на анти-IgE антитела при культивировании крови в присутствии высоких доз преднизолона. Антигистаминные препараты блокируют эффект гистамина по механизму конкурентного ингибирования, но не влияют на его высвобождение из гранул базофилов при активации. Описаны различные механизмы противоаллергического и иммуносупрессивного действия глюкокортикостероидных препаратов, которые включают модулирование экспрессии генов с про- и противовоспалительной активностью, ингибирование фосфолипазы A2, опосредующей снижение синтеза простагландинов и лейкотриенов, снижение возможности связывания иммуноглобулинов с их рецепторами на поверхности клеток и др. [4].

Таким образом, при подготовке пациента к диагностике сенсibilизации с применением теста активации базофилов не требуется исключение блокаторов H1-гистаминовых рецепторов, а временная отмена глюкокортикостероидной терапии приведет к более корректному выявлению аллергена.

В настоящее время тест активации базофилов разрешен к применению в России согласно Федеральным клиническим рекомендациям Российской Ассоциации клинических иммунологов и аллергологов для диагностики пищевой [9] и лекарственной [8] сенсibilизации. Этот метод лабораторной диагностики получил признание на мировом уровне. Ввиду хорошей сопоставимости результатов теста активации базофилов и назального провокационного теста [16] у пациентов с аллергическим ринитом для установления профиля сенсibilизации с целью назначения АСИТ он предлагается авторами как альтернативный метод при невозможности проведения провокационного тестирования. Согласно позиционному документу World Allergy Organization [11] рекомендовано использование теста активации базофилов в диагностике IgE-опосредованной аллергии в сложных случаях и при наличии противоречивых данных других методов.

Заключение

В нашем исследовании тест активации базофилов показал как высокую специфичность

(94%), так и достаточно высокую чувствительность (88%) для подтверждения сенсibilизации к аллергенам клещей домашней пыли. Эти показатели сопоставимы с параметрами, характерными для результатов кожного тестирования. Высокий индекс активации базофилов на аллерген выявлен у пациентов с тяжелым течением аллергопатологии. Показана высокая корреляционная зависимость между результатами, полученными с помощью наборов Allergenicity kit и BD FastImmune, которые используют разные маркеры для идентификации и оценки активации базофилов. Терапия глюкокортикостероидными препаратами снизила чувствительность выявления сенсibilизации в тесте активации базофилов. Применение блокаторов H1-гистаминовых рецепторов не повлияло на результат тестирования. Ввиду доказанной высокой клинической значимости теста активации базофилов для диагностики сенсibilизации к ингаляционным аллергенам в перспективе необходимо дополнить спектр разрешенных в отечественных Клинических рекомендациях методов для подтверждения сенсibilизации у пациентов с аллергическим ринитом и бронхиальной астмой этим тестом. Применение чувствительного лабораторного метода будет способствовать улучшению диагностики причинно-значимого аллергена и, соответственно, назначению корректной терапии.

Список литературы / References

1. Бычкова Н.В., Селиванов П.А., Калинина Н.М. Клиническая значимость выявления сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии // Клиническая лабораторная диагностика, 2021. Т. 66, № 12. С. 747-754. [Bychkova N.V., Selivanov P.A., Kalinina N.M. Clinical significance of detecting sensitization to iodine-containing radiopaque substances in the basophil activation test by flow cytometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, Vol. 66, no. 12, pp. 747-754. (In Russ.)]
2. Воронцова И.М., Коровкина Е.С. Стратегия и тактика аллергенспецифической иммунотерапии у полисенсibilизированных пациентов // Педиатрия, 2016. Т. 95, № 6. С. 139-144. [Vorontsova I.M., Korovkina E.S. Strategy and tactics of allergen-specific immunotherapy in polysensitized patients. *Pediatriya = Pediatrics*, 2016, Vol. 95, no. 6, pp. 139-144. (In Russ.)]
3. Коровкина Е.С., Мокроносова М.А. Аллергия к клещам домашней пыли с позиций молекулярной аллергологии // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 279-288. [Korovkina E.S., Mokronosova M.A. Allergy to house dust mites from the standpoint of molecular allergology. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 279-288. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-279-288.
4. Ландышев Ю.С. Механизмы действия и основные терапевтические эффекты глюкокортикоидов // Амурский медицинский журнал, 2014. Т. 1, № 5. С.10-29. [Landyshev Yu.S. Mechanisms of action and main therapeutic effects of glucocorticoids. *Amurskiy meditsinskiy zhurnal = Amur Medical Journal*, 2014, Vol. 1, no. 5, pp. 10-29. (In Russ.)]
5. Федеральные клинические рекомендации по диагностике аллергических заболеваний // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 170-189. [Federal clinical guidelines for the diagnosis of allergy diseases [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 170-189.
6. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению аллергического ринита // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И.

М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 34-51. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of allergic rhinitis [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 34-51.

7. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению аллергического конъюнктивита // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 22-33. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of allergic conjunctivitis [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.] Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 22-33.

8. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению лекарственной аллергии // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 190-213. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of drug allergy [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 190-213.

9. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с пищевой аллергией, 2015 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://nrcci.ru/docs/Klinicheskie_rekomendacii_po_diagnostike_AZ.pdf. [Federal clinical guidelines for the provision of medical care to children with food allergy, 2015. [Electronic resource]. Access mode: http://nrcci.ru/docs/Klinicheskie_rekomendacii_po_diagnostike_AZ.pdf.

10. Федеральные клинические рекомендации. Атопическая бронхиальная астма // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 90-136. [Federal clinical guidelines. Atopic bronchial asthma [Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.] Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 90-136.

11. Ansotegui I.J., Melioli G., Canonica G.W., Caraballo L., Villa E., Ebisawa M., Passalacqua G., Savi E., Ebo D., Gómez R.M., Luengo Sánchez O., Oppenheimer J.J., Jensen-Jarolim E., Fischer D.A., Haahtela T., Antila M., Bousquet J.J., Cardona V., Chiang W.C., Demoly P.M., DuBuske L.M., Ferrer Puga M., van Wijk R.G., González Díaz S.N., Gonzalez-Estrada A., Jares E., Kalpaklioglu A.F., Kase Tanno L., Kowalski M.L., Ledford D.K., Monge Ortega O.P., Morais Almeida M., Pfaar O., Poulsen L.K., Pawankar R., Renz H.E., Romano A.G., Rosário Filho N.A., Rosenwasser L., Sánchez Borges M.A., Scala E., Senna G.E., Sisul J.C., Tang M.L.K., Thong B.Y., Valenta R., Wood R.A., Zuberbier T. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ. J.*, 2020, Vol. 13, no. 2, 100080. doi: 10.1016/j.waojou.2019.100080.

12. Campo P., Eguluz-Gracia I., Bogas G., Salas M., Plaza Serón C., Pérez N., Mayorga C., Torres M.J., Shamji M.H., Rondon C. Local allergic rhinitis: Implications for management. *Clin. Exp. Allergy*, 2019, Vol. 49, no. 1, pp. 6-16.

13. Eberlein-König B., Varga R., Mempel M., Darsow U., Behrendt H., Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 9, pp. 1084-1085.

14. Gómez E., Campo P., Rondón C., Barrionuevo E., Blanca-López N., Torres M.J., Herrera R., Galindo L., Mayorga C., Blanca M. Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 4, pp. 975-976.e1-5.

15. Imamura S., Washio K., Mizuno M., Oda Y., Fukunaga A., Nishigori C. Activated steady status and distinctive FcεRI-mediated responsiveness in basophils of atopic dermatitis. *Allergol. Int.*, 2021, Vol. 70, no. 3, pp. 327-334.

16. Leśniak M., Dyga W., Rusinek B., Mazur M., Czarnobilska E. Comparison of the basophil activation test versus the nasal provocation test in establishing eligibility for specific immunotherapy. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2016, Vol. 126, no. 7-8, pp. 521-529.

17. Li Y., Liu C., Li H., Wang X. Exploring the role of basophil activation test in diagnosis of *Dermatophagoides farinae* sensitization and evaluation of therapeutic efficacy of subcutaneous immunotherapy in children. *Scand. J. Immunol.*, 2022, e13168. doi: 10.1111/sji.13168.

18. Ogulur I., Kiykim A., Baris S., Ozen A., Yuce E.G., Karakoc-Aydiner E. Basophil activation test for inhalant allergens in pediatric patients with allergic rhinitis. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2017, Vol. 97, pp. 197-201.

19. Ren H.L., Li J.D., Miao Y.H., Xu T. Clinical investigation of basophil activation test as a complementary test for house dust mite allergen. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2018, Vol. 32, no. 5, pp. 365-368. (In Chinese).

20. Rosales A., López-García A.I., Rivero-Yeverino D., Arana-Muñoz O., Papaqui-Tapia J.S., Caballero-López C.G., Ortega-López L., Cruz-Hernández A., Ruiz-Márquez I.P., Valle-Rodríguez F. Sensibilidad y especificidad de la prueba epicutánea modificada en el diagnóstico de alergia respiratoria a *Dermatophagoides pteronyssinus* [Sensitivity and specificity of the modified epicutaneous patch test in the diagnosis of respiratory allergy to *Dermatophagoides pteronyssinus*]. *Rev. Alerg. Mex.*, 2019, Vol. 66, no. 1, pp. 38-43. (In Spanish).

21. Stemeseder T., Schweidler B., Doppler P., Klinglmayr E., Moser S., Lueftenegger L., Himly M., Lang R., Zumbach J., Oostingh G.J., Hawranek T., Bathke A.C., Gadermaier G. Exposure to Indoor Allergens in Different Residential Settings and Its Influence on IgE Sensitization in a Geographically Confined Austrian Cohort. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 1, e0168686. doi: 10.1371/journal.pone.0168686.

22. Sturm G.J., Kranzelbinder B., Sturm E.M., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*, 2009, Vol. 64, no. 9, pp. 1319-1326.

23. Testera-Montes A., Palomares F., Jurado-Escobar R., Fernandez-Santamaria R., Ariza A., Verge J., Salas M., Campo P., Mayorga C., Torres M.J., Rondon C., Eguiluz-Gracia I. Sequential class switch recombination to IgE and allergen-induced accumulation of IgE⁺ plasmablasts occur in the nasal mucosa of local allergic rhinitis patients. *Allergy*, 2022. doi: 10.1111/all.15292.

24. Traiyan S., Manuyakorn W., Kanchongkittiphon W., Sasisakulporn C., Jotikasthira W., Kiewngam P., Kamchaisatian W., Benjaponpitak S. Skin prick test versus phadiatop as a tool for diagnosis of allergic rhinitis in children. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2021, Vol. 35, no. 1, pp. 98-106.

Авторы:

Бычкова Н.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Крутикова И.В. — врач — аллерголог-иммунолог высшей категории терапевтического отделения поликлиники ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Чернышова А.В. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. — д.м.н., главный научный сотрудник научно-исследовательского отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Bychkova N.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Krutikova I.V., Clinical Allergologist/Immunologist, Therapeutic Polyclinic Department, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Chernyshova A.V., PhD (Medicine), Clinical Allergologist/Immunologist, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine; Professor, Department of Immunology, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

РАННЯЯ ПРОДУКЦИЯ IgE СВЯЗАНА С НАКОПЛЕНИЕМ CD11b⁺ КЛАССИЧЕСКИХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И CD11b⁺CD11c⁻ МАКРОФАГОВ В ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Чудаков Д.Б., Коновалова М.В., Коцарева О.Д., Шевченко М.А.,
Стрельцова М.А., Сергеев А.А., Фаттахова Г.В.

ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. В связи с увеличением частоты возникновения IgE-опосредованных патологий как в России, так и в мире, внимание различных исследовательских групп приковано к изучению механизмов, запускающих процесс переключения В-лимфоцитов на IgE при попадании в организм безвредных аллергенов, а также к изучению роли различных типов антигенпрезентирующих клеток (АПК) в этом процессе. Однако роль различных АПК в презентации попадающих за барьер в течение длительного времени низких доз антигена и специфика данных процессов при попадании антигена через подкожную жировую клетчатку, содержащую тканеассоциированные лимфоидные кластеры (ТАЛК), изучена плохо. Целью настоящей работы являлось определение связи накопления локально в подкожной жировой ткани различных типов АПК и формирования ранней продукции IgE в клинически релевантной модели аллергии, предполагающей длительное введение низких доз аллергена. Данная модель обуславливает формирование продукции специфического IgE при минимальной сопутствующей продукции IgG, что имитирует ситуацию, наблюдаемую у больных с аллергией в клинической практике.

Мыши линии BALB/c были иммунизированы в течение 4 недель подкожно в область холки или внутрибрюшинно низкими (100 нг) или высокими (10 мкг) дозами модельного аллергена овальбумина. Через каждые 7 дней у мышей отбирали образцы крови для получения сывороток и для определения продукции специфических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА), проводили провокацию высокой дозой аллергена и получали образцы жировой ткани в месте введения антигена для анализа содержания различных субпопуляций АПК методом проточной цитометрии.

Продукция специфического IgE формировалась в основном при введении антигена в низких (100 нг) дозах подкожно, в область холки. В работе наблюдали накопление в жировой ткани области холки, но не в интраперитонеальной жировой ткани, CD11b⁺ классических, но не CD11b⁻ классических, воспалительных или плазмацитоидных, дендритных клеток, совпадающее с моментом усиления про-

Адрес для переписки:

Чудаков Дмитрий Борисович
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел./факс: 8 (499) 330-40-11.
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru

Address for correspondence:

Dmitry B. Chudakov
M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences
117997, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maclay str., 16/10.
Phone/fax: +7 (499) 330-40-11.
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.Б. Чудаков, М.В. Коновалова, О.Д. Коцарева,
М.А. Шевченко, М.А. Стрельцова, А.А. Сергеев,
Г.В. Фаттахова «Ранняя продукция IgE связана
с накоплением CD11b⁺ классических дендритных
клеток и CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов в подкожной
жировой ткани» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 6. С. 1189-1204.
doi: 10.15789/1563-0625-EIP-2560

© Чудаков Д.Б. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.B. Chudakov, M.V. Konovalova, O.D. Kotsareva,
M.A. Shevchenko, M.A. Strelitsova, A.A. Sergeev,
G.V. Fattakhova "Early IgE production is associated with
accumulation of CD11b⁺ classical dendritic cells and
CD11b⁺CD11c⁻ macrophages in subcutaneous adipose tissue",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1189-1204.
doi: 10.15789/1563-0625-EIP-2560

© Chudakov D.B. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EIP-2560

дукции специфического IgE на 14-21-е сутки. Накопление CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов и их CD206⁺ M2-субпопуляции на ранние сроки (7-е и 21-е сутки) также наблюдали только при введении антигена подкожно в область холки. Введение высоких (10 мкг) доз антигена, опосредующих формирование продукции IgG₁ в большей степени, чем IgE, приводило к более ранней индукции накопления CD11b⁺ классических дендритных клеток (на 7-е сутки) и отсутствию накопления макрофагов на более поздних стадиях (21-е сутки).

Таким образом, ранний запуск продукции специфического IgE при попадании низких доз антигена в подкожную жировую ткань может быть связан с его презентацией CD11b⁺ классическими дендритными клетками в присутствии CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов.

Ключевые слова: IgE, гиперчувствительность I типа, низкие дозы антигена, подкожная жировая ткань, антигенпрезентирующие клетки, CD11b⁺ классические дендритные клетки, макрофаги, M2-макрофаги, проточная цитометрия, лабораторные животные

EARLY IgE PRODUCTION IS ASSOCIATED WITH ACCUMULATION OF CD11b⁺ CLASSICAL DENDRITIC CELLS AND CD11b⁺CD11c⁻ MACROPHAGES IN SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE

Chudakov D.B., Konovalova M.V., Kotsareva O.D., Shevchenko M.A., Streltsova M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V.

M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. In view of increased incidence of IgE-mediated diseases in Russia and worldwide, the efforts of various research groups are focused on studying the mechanisms that trigger the process of switching B-lymphocytes to IgE synthesis upon human exposure to harmless allergens, including the role of various antigen-presenting cells (APCs) in this process. However, the role of distinct APCs upon long-term penetration of low antigen doses *via* the tissue barriers, is yet poorly understood, as well as specific features of these events upon entrance of the antigen through the subcutaneous adipose tissue which contains tissue-associated lymphoid clusters (TALC). The aim of this work was to determine the relationship between the local accumulation of various APCs in the subcutaneous adipose tissue and development of early IgE production in a clinically relevant experimental model of allergy with long-term administration of low allergen doses. In this experimental model, specific IgE synthesis is induced, with minimal concomitant IgG production, thus mimicking the situation observed in patients with clinically sound allergies. BALB/c mice were immunized for 4 weeks subcutaneously in the withers area or intraperitoneally with low (100 ng) or high (10 µg) doses of the model allergen (ovalbumin). Blood samples were taken weekly from mice for ELISA testing, to determine the production of specific antibodies. Provocation tests were performed with high dose of the allergen, and adipose tissue samples were taken from the site of antigen injection for flow cytometric assays, in order to evaluate the contents of various APC subpopulations. Specific IgE production was induced mainly by subcutaneous injection of the antigen at low doses (100 ng) into the area of withers. When using this experimental regimen, we observed accumulation of classical CD11b⁺ cells in adipose tissue at the withers site, but not in the peritoneal adipose tissue, in absence of CD11b⁻ classical, inflammatory or plasmacytoid, dendritic cells. These findings coincided in time with increased production of specific IgE on days +14 to +21. Accumulation of CD11b⁺CD11c⁻ macrophages and their CD206⁺ M2 subpopulations at early terms (days +7 and +21) was also observed only after subcutaneous injection of the antigen into the withers area. The high-dose antigen injection (10 µg) which mediated IgG₁ production to greater extent than production of IgE, led to earlier accumulation of CD11b⁺ classical dendritic cells (on day 7th), and to the absence of macrophage accumulation at later stages (day 21th). Thus, the early start of specific IgE production upon low-dose injection of the antigen into the subcutaneous adipose tissue may be associated with its presentation by CD11b⁺ classical dendritic cells in the presence of CD11b⁺CD11c⁻ macrophages.

Keywords: IgE, type I hypersensitivity, low-dose antigen, subcutaneous fat tissue, antigen-presenting cells, CD11b⁺ classical dendritic cells, macrophages, M2 macrophages, flow cytometry, laboratory animals

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-05-50064.

Введение

Проблема, связанная с ростом частоты возникновения IgE-опосредованных иммунопатологий, к которым относятся бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит, гиперчувствительность на ряд продуктов питания, является актуальной как в России, так и за рубежом [1, 24]. Несмотря на длительное изучение процессов формирования продукции IgE при попадании в организм безвредных аллергенов, механизмы, инициирующие синтез IgE В-лимфоцитами, во многом остаются неизвестными [24].

Одним из многих аспектов, вокруг которых ведутся дискуссии, является участие различных типов антигенпрезентирующих клеток в запуске продукции IgE. Ряд исследований подтверждают роль дендритных клеток и макрофагов на поздних стадиях аллергического воспаления [2, 5, 12, 18, 23, 25]. Профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АПК) несомненно играют роль на ранних стадиях при запуске продукции IgE [12, 18, 23, 25]. Однако до конца неясно, какой тип АПК является наиболее важным в индукции состояния сенсилизации. Большинство исследователей полагают, что наиболее важную роль в запуске продукции аллерген-специфических антител играют дендритные клетки, а именно – CD11b⁺ классические (т. е. формируемые из костномозговых предшественников) дендритные клетки, отвечающие за начальные этапы трафика антигена [23]. Подобные дендритные клетки легких при взаимодействии с Т-хелперами 0 (Th0) склонны к индукции поляризации последних в Т-хелперы 2 (Th2) [12]. Этот процесс зависит от экспрессии на поверхности дендритных клеток костимуляторных молекул, таких как CD80, CD86, OX40L, которая регулируется цитокинами, выделяемыми при повреждении тканей – IL-33, TSLP (тимическим стромальным лимфопоэтином) и в меньшей степени IL-25 [1, 4, 6]. В то же время CD11b⁻ классические дендритные клетки, имеющие иной профиль экспрессии генов и поверхностных ко-стимуляторных молекул, при активации склонны стимулировать формирование анти-аллергических Т-хелперов 1 (Th1) [25].

Помимо классических дендритных клеток в трафике антигена, поступающего через барьерные ткани, могут принимать участие воспалительные дендритные клетки [23]. Этот тип дендритных клеток характеризуется наличием поверхностной экспрессии высокоаффинного FcεRI рецептора для IgE (и способностью соот-

ветственно транспортировать иммунные комплексы аллергена и IgE) и CD64 [18, 25]. Воспалительные дендритные клетки дифференцируются из моноцитов [18]. Их дифференцировка связана с наличием воспалительных цитокинов, либо некоторых аларминов, например внеклеточной ДНК [16, 18]. Популяция плазмацитоидных дендритных клеток характеризуется экспрессией маркера B220 и секрецией интерферонов I типа. Эти клетки обладают слабой способностью к презентации антигена и обычно ингибируют развитие иммунологических реакций [18, 25].

Хотя макрофаги и В-лимфоциты также относятся к профессиональным АПК, принято считать, что индуцировать первичную активацию наивных Т- и В-лимфоцитов они не могут, а участвуют на более поздних стадиях или во вторичном иммунном ответе [20]. Несмотря на это, данные некоторых работ позволяют утверждать, что макрофаги и В-лимфоциты также могут служить первичными АПК (антигенпрезентирующими клетками) [9, 13, 19]. Кроме того, продуцируя провоспалительные цитокины, такие как IL-6 и TNFα, макрофаги могут опосредованно поддерживать формирование аллергического воспаления и продукцию антител [2, 3]. Особый подтип активированных макрофагов – M2-макрофаги, отличающиеся экспрессией CD206, продуцирует иммуносупрессорные цитокины IL-10, TGF-β1, а также FIZZ1 (Found in inflammatory zone 1, «Найденный в зоне воспаления продукт 1»), иначе называемый RELMα (Resistin-like molecule α, «Резистин-подобный продукт α»), необходимый для ремоделирования эпителиального барьера, что также влияет на ход аллергического воспаления [10].

Основные работы, в которых изучали роль разных типов АПК в трафике и презентации антигена при первичном ответе на аллерген, выполнены на моделях аллергии с использованием высоких доз аллергена и (или) адьювантов, в которых продукция IgE сопровождается существенной продукцией специфического IgG [8, 12, 13, 23]. Ранее нами была предложена модель аллергии на лабораторных мышах линий BALB/c и CD1, предполагающая использование низких доз антигена, вводимых подкожно в область холки, богатую тканеассоциированными лимфоидными кластерами (ТАЛК), и приводящая к формированию более селективной продукции IgE [7, 11]. Такая индукция синтеза IgE, сопровождающаяся небольшой продукцией IgG, наблюдается у больных с различными видами аллергии, что было показано различными исследователями и нами ранее [21, 26, 28]. Разработанная модель, таким образом, является более клинически релевантной. Она же оптимально подходит для изучения

роли ТАЛК, связанных с подкожной жировой тканью, в формировании специфического ответа на аллерген, поступающий через кожные аллергены, что должно иметь место при atopическом дерматите. Несмотря на имеющиеся литературные данные о значении ТАЛК подкожного жира в локальном иммунном ответе [14, 17], ведущая роль ТАЛК в формировании первичной продукции специфического IgE была показана нами лишь недавно [11], а роль в этом процессе разных типов АПК не известна. Клеточный состав (в том числе по типам АПК) в таких структурах может отличаться от состава ТАЛК в жировой ткани брюшной полости. Каждый отдельный тип АПК может играть свою роль при ответе на низкие и высокие дозы антигена. Именно особенный тип АПК, участвующий в презентации низких (но не высоких) доз антигена при подкожном, а не внутрибрюшинном введении мог быть причиной более селективной индукции специфического IgE в нашем случае.

Целью данной работы было определить роль различных субпопуляций АПК в ранней индукции локального переключения В-лимфоцитов на синтез IgE в ТАЛК подкожного жира в условиях введения низких доз антигена.

Материалы и методы

Животные

В опытах использовали мышей линии BALB/c, самок, возраст 8 недель. Животные содержались при 12-часовом цикле день/ночь в конвенционных условиях в виварии 2 недели до начала опыта и в течение всего опыта до забоя. Кормление осуществлялось *ad libitum*. Все манипуляции с животными были произведены согласно протоколу, одобренному комиссией по работе с лабораторными животными ФГБУН ИБХ РАН, № 149.

Иммунизация и провокация аллергеном

В качестве аллергена использовали стандартный антиген овалбумин OVA (Grade V, SigmaAldrich). Антиген разводили физиологическим раствором (ООО «Мосфарм», Россия) до нужной концентрации, после чего вводили подкожно в область холки или внутрибрюшинно (в/б). Введение осуществлялось в объеме 100 мкл, в дозе 100 нг или 10000 нг (10 мкг). Иммунизацию проводили 3 раза в неделю в течение 4 недель (28 дней). Часть мышей выводили из эксперимента на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни, для провокации высокой дозой антигена и последующего получения образцов сывороток и ткани холки. Число животных в группе *n* составляло 5 особей.

Провокация осуществлялась во всех группах введением разрешающей (250 мкг в 200 мкл) в/б с последующим замером температуры тела инфракрасным бесконтактным термометром (модель SEM DT8806S) в течение 60 минут, каждые 15

минут, как в работе [15]. По результатам для каждой мыши было установлено время, соответствующее наибольшему падению температуры (почти всегда 45 минут после введения разрешающей дозы) и рассчитана величина падения температуры на данный срок.

Получение сывороток и первичных клеток из тканей

Образцы крови брались из подглазничного синуса под изофлурановой (Aeran, Baxter) анестезией. Образцы инкубировали 20 минут при +37 °C а затем центрифугировали (600 g) для получения сывороток, которые сохранялись до момента использования при -20 °C.

Для получения образцов для проточной цитометрии мышей забивали методом цервикальной дислокации. Жировая ткань области холки была извлечена и гомогенизирована. Полученную суспензию клеток в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH = 7,2 центрифугировали при скорости 300 g, в течение 7 минут для отделения дебриса и адипоцитов (последние всплывали на поверхность). Осадок ресуспендировали в FACS буфере (ФСБ с добавлением 0,5%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,01% NaN₃), пропускали через клеточный фильтр (Millipore, 80 мкм).

Постановка иммуноферментного анализа

Для постановки иммуноферментного анализа (ИФА) при определении специфических IgE или IgG₁ в лунки 96-луночного планшета (Costar, MaxiSorp) наносили по 50 мкл раствора OVA с концентрацией 20 мкг/мл или 5 мкг/мл соответственно, и оставляли при +4 °C на ночь. После этого и далее между каждой стадией осуществляли отмывку раствором Твин-20 0,05% в ФСБ минимум трехкратно, с использованием автоматического промывателя ПП2-428 («Иммедтех», Москва). Планшеты блокировали раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) концентрации 5% (при определении IgE) или 1% (при определении IgG₁), 1 час при комнатной температуре. Затем наносились сыворотки в различных разведениях и инкубировались при +4 °C на ночь. Для определения специфического IgE добавляли конъюгат анти-мышинных IgE, меченных пероксидазой хрена (ПХ), в разведении 1:1000 (клон 23G3, Abscam, США), для определения специфических IgG₁ — биотинилированные антитела к IgG₁ мыши в разведении 1:5000 (клон RMG1-1, BioLegend, США) на 2 часа при комнатной температуре. В последнем случае в качестве вторичного конъюгата использовали стрептавидин, конъюгированный с ПХ, в разведении 1:7000 (BioLegend), с последующей инкубацией в течение 1 часа. Проявление осуществлялось с использованием субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Блокирование реакции ТМБ и пероксида водорода осуществлялось добавлением 10% H₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) про-

дукта реакции определяли на спектрофотометре (Multiscan FC, ThermoScientific) при длине волны 450 нм за вычетом ОП при 620 нм как обусловленной неспецифическим светопоглощением. Титр сыворотки рассчитывался путем экстраполяции титровочной кривой как разведение, при котором ОП становилась равной ОП фона в лунках, куда не были нанесены образцы, плюс три стандартных отклонения.

Проточная цитометрия

Полученные образцы клеток были окрашены антителами к антигенам мыши коммерческой фирмы BioLegend в разведении, рекомендованном производителем. Использовались следующие антитела: антитела к FcεRI, меченные BV510 (клон MAR1); к CD11c, меченные FITC (клон N418); к CD11b, меченные PE (клон M1/70); к CD206, меченные PerCP (клон C068C2); к общим эпитопам I-A/I-E молекул МНСII, меченные APC (клон M5/114.15.2); к B220, меченные APC-Cy7 (клон RA3-6B2). Инкубация с антителами осуществлялась в течение часа при +4 °С. За 15 минут до цитометрии к клеткам был добавлен ядерный краситель DAPI для исключения дедбриса и мертвых клеток. Цитометрия осуществлялась на приборе MACS QuantTitoSorter (Milteniy Biotech, Германия). При анализе учитывалось не менее 3×10^4 клеток в гейте лимфоцитов в каждом образце. Анализ данных производили в программе FlowJo V10. Общая стратегия гейтинга клеток показана на рисунке 1. Макрофаги определяли как CD11b⁺CD11c⁻ клетки; M2-макрофаги как CD206⁺CD11b⁺CD11c⁻ [29]; дендритные клетки как CD11c⁺; воспалительные дендритные клетки как CD11c⁺FcεRI⁺CD11b⁺ [18, 25]; плазмацитоидные дендритные клетки среди как B220⁺CD11b⁻ среди невоспалительных CD11c⁺; конвенционные дендритные клетки (CD11b^{-/+}) как МНСII⁺ среди CD11c⁺, не относящихся к воспалительным или плазмацитоидным [18, 25].

Статистический анализ

Анализ результатов и их оформление осуществлялось в MS Excel. Статистический анализ достоверности различий между группами осуществлялся с помощью непараметрического теста Манна–Уитни (U test). При этом статистически значимыми принимались различия между сравниваемыми группами при $p < 0,05$. При построении графиков использовали среднее арифметическое значение показателя в группе и отмечали нормированное стандартное отклонение.

Результаты

Производство аллерген-специфических антител у мышей линии BALB/c при иммунизации разными способами

Для определения связи накопления различных АПК и ранней продукции аллерген-специфических антител мышей линии BALB/c иммунизировали низкими дозами антигена по двум

протоколам – подкожно (п/к) в область холки или внутрибрюшинно (в/б), и забивали на разные сроки для взятия образцов. Результаты, представленные на рисунке 2А, подтверждают более раннее и более интенсивное формирование (начиная с 14-х суток) продукции специфического IgE при иммунизации в область холки, что согласуется с нашими предыдущими данными [11], в то время как при в/б иммунизации достоверная продукция специфического IgE появлялась лишь на 28-е сутки. Продукцию специфического IgG₁ при иммунизации в область холки наблюдали одновременно с продукцией IgE. Эти процессы индуцировались на более ранних этапах иммунизации по сравнению с биосинтезом антител при внутрибрюшном введении антигена (рис. 2Б). При в/б иммунизации достоверная продукция IgG₁ происходила с незначительным опережением продукции IgE у тех же мышей, но позже, чем при иммунизации в область холки (рис. 2Б). Результаты измерения величины падения температуры, прямо пропорциональной интенсивности системной анафилактической реакции, указывают на формирование высокоаффинных анафилактогенных антител к аллергену именно у мышей, иммунизированных п/к в область холки, но не в/б (рис. 2В). Данные рисунка 2 продублированы в таблице 1.

Анализ накопления различных субпопуляций тканевых АПК у мышей линии BALB/c на разные сроки при иммунизации разными способами

Поскольку ранее нами было показано, что индукция переключения В-лимфоцитов на синтез IgE антител при иммунизации в область холки происходит на ранних сроках (в первые 3 недели) исключительно в подкожной жировой ткани в месте попадания аллергена (но не в региональных лимфоузлах) [11], при анализе фенотипа АПК в настоящей работе мы решили остановиться на изучении именно тканевых АПК.

Схема стратегии определения основных субпопуляций АПК показана на рисунке 1. Введение низких доз антигена не вызывало накопления воспалительных, плазмацитоидных или CD11b⁻ классических дендритных клеток ни в подкожном жире области холки, ни в интраперитонеальном жире при соответствующих способах иммунизации, напротив, наблюдалось снижение их содержания. Для воспалительных дендритных клеток достоверное снижение содержания наблюдали на 14-е сутки ($p = 0,026$), для плазмацитоидных на 28-е сутки ($p = 0,003$), для CD11b⁻ классических оно наблюдалось также на наиболее поздний срок и было достоверно ($p = 0,018$) лишь для интраперитонеального жира (рис. 3А, Б, Г, и табл. 2). В то же время было отмечено достоверное накопление содержания CD11b⁺ классических дендритных клеток в жировой ткани области холки на 21-е сутки в срав-

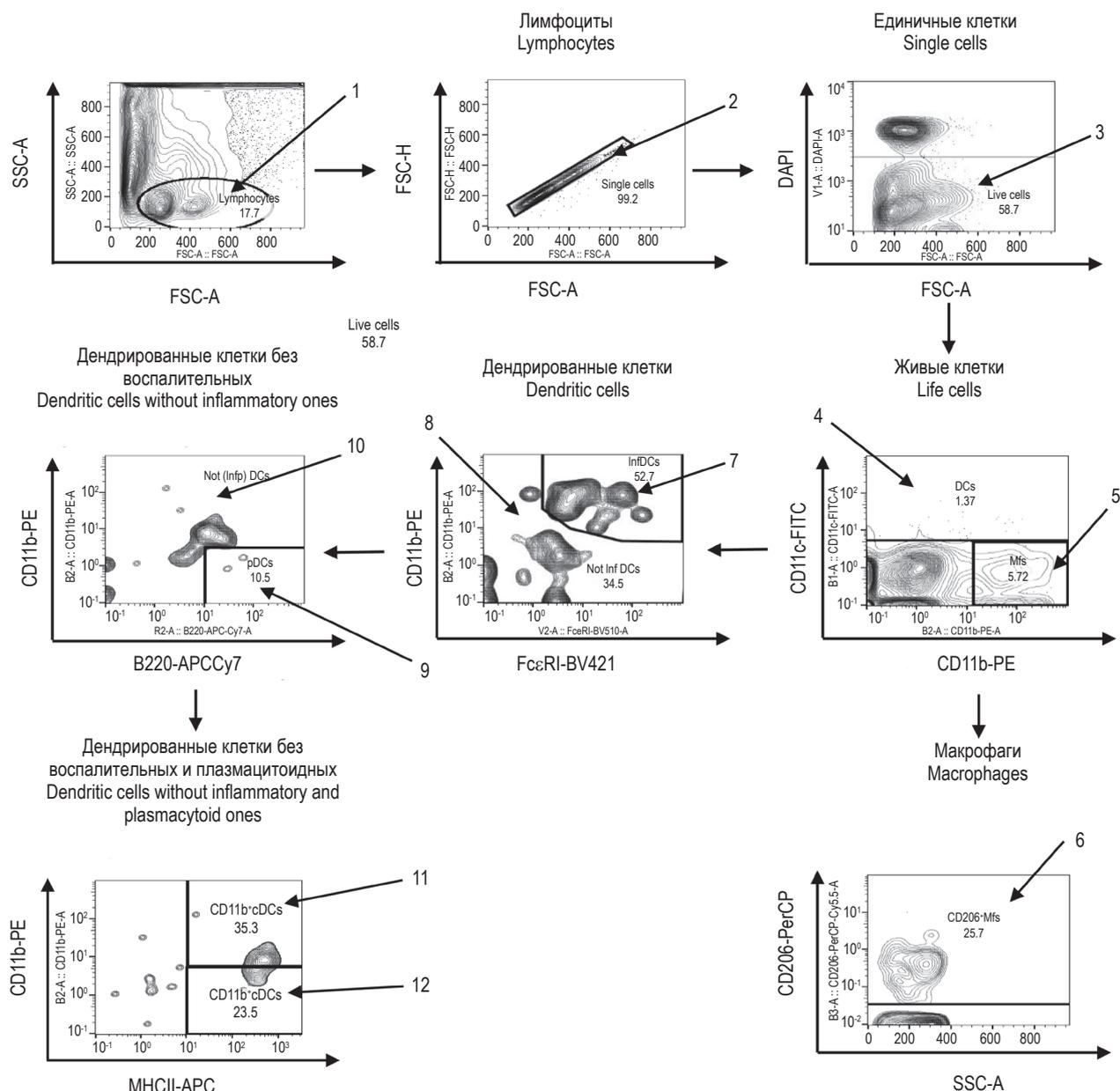


Рисунок 1. Стратегия гейтирования субпопуляций антигенпрезентирующих клеток

Примечание. Курсивом над гистограммами распределения клеток даны подписи субпопуляций, на которые осуществлялся предварительный гейтинг при получении данной гистограммы. Цифрами на гистограммах распределения клеток указаны следующие субпопуляции иммунных клеток: 1 – лимфоциты; 2 – единичные клетки; 3 – живые клетки; 4 – дендритные клетки; 5 – макрофаги; 6 – CD206⁺ макрофаги; 7 – воспалительные дендритные клетки; 8 – дендритные клетки без воспалительных; 9 – плазмацитоидные дендритные клетки; 10 – дендритные клетки без воспалительных и плазмацитоидных; 11 – CD11b⁺ классические дендритные клетки; 12 – CD11b⁻ классические дендритные клетки.

Figure 1. Antigen presenting cells gating strategy

Note. Italics above the histograms of cell distribution are labels of subpopulations, which were pre-gated when obtaining this histogram. Numbers on cell distribution histograms indicate the following subpopulations of immune cells: 1, lymphocytes; 2, single cells; 3, life cells; 4, dendritic cells; 5, macrophages; 6, CD206⁺ macrophages; 7, inflammatory dendritic cells; 8, dendritic cells without inflammatory ones; 9, plasmacytoid dendritic cells; 10, dendritic cells without inflammatory and plasmacytoid ones; 11, CD11b⁺ classical dendritic cells; 12, CD11b⁻ classical dendritic cells.

нении с интактными животными ($p = 0,003$) и недостаточно достоверное на 14-е ($p = 0,053$) (рис. 3В, табл. 2). Напротив, в интраперитонеальном жире, в котором изначальное содержание АПК у интактных мышей выше, чем в подкожном жире, наблюдали тенденции к снижению содержания

CD11b⁺ классических дендритных клеток, достигающие статистической достоверности на поздний (28-е сутки) срок ($p = 0,03$) (рис. 3В, табл. 2). Таким образом, логично предполагать участие именно CD11b⁺ классических дендритных клеток в локальной презентации антигена. Накопле-

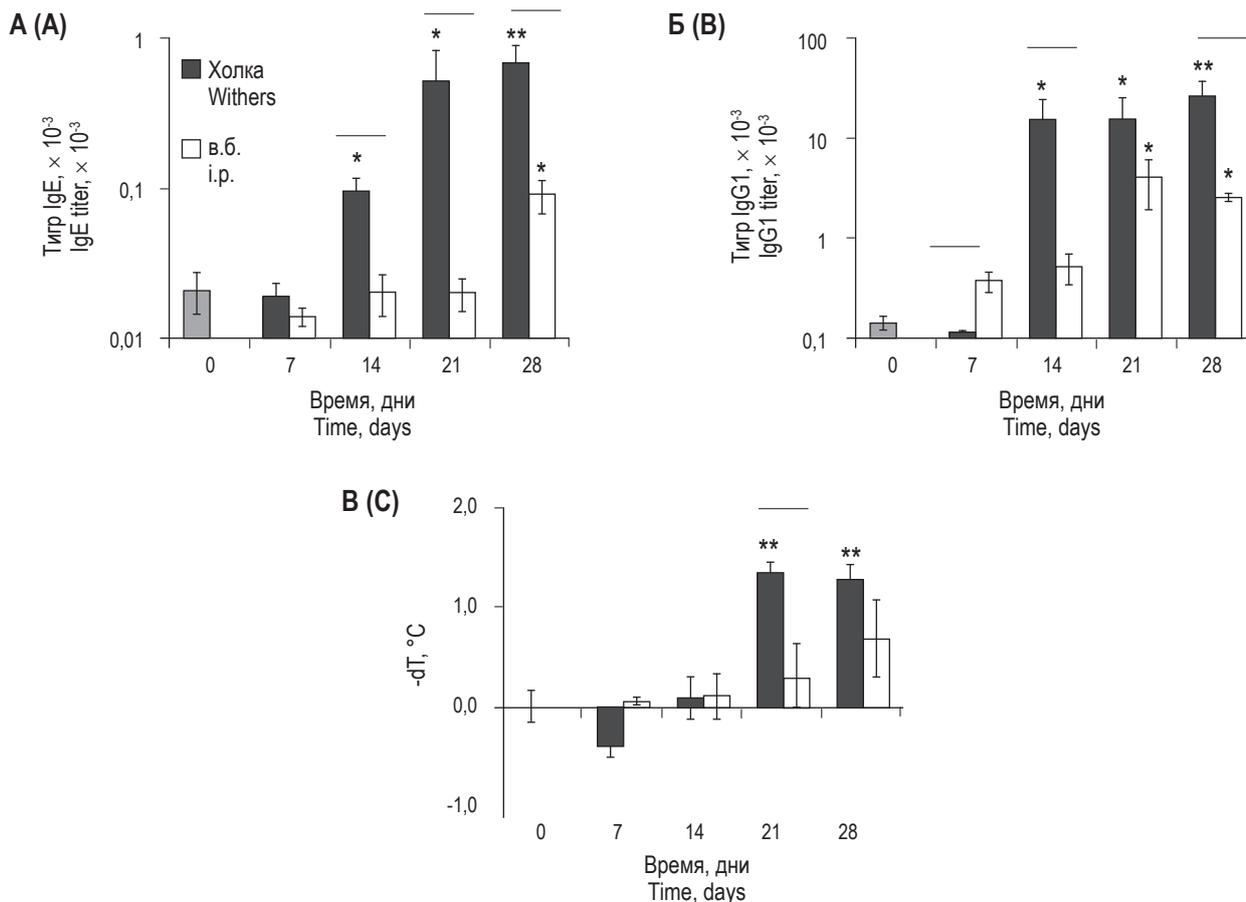


Рисунок 2. Продукция специфических антител и интенсивность системной анафилактической реакции у мышей после длительного введения низких (100 нг) доз антигена

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю в течение 4 недель низкими (100 нг) дозами OVA подкожно в область холки («холка», черные столбики) или внутривбрюшинно («в/б», белые столбики). Продукция специфических антител классов IgE (А) и IgG₁ (Б), а также величина падения температуры через 45 минут после введения разрешающей (250 мкг) дозы антигена (В) на различные сроки протокола иммунизации в сравнении с интактной группой (серые столбики). **/* – $p < 0,05/0,01$ в сравнении с интактной группой. Тонкие/толстые планки – $p < 0,05/0,01$ при сравнении групп, иммунизированных в область холки и внутривбрюшинно, на тот же временной срок.

Figure 2. Production of specific antibodies and the intensity of systemic anaphylactic reaction in mice after prolonged administration of low (100 ng) doses of antigen

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week for 4 weeks with low (100 ng) doses of OVA subcutaneously at the withers (“withers”, black bars) or intraperitoneally (“i.p.”, white bars). Specific IgE (A) or IgG₁ (B) productions, as well as the magnitude of temperature decrease 45 minutes after antigen challenging dose (250 μg) administration (C) at different time points of immunization protocol in comparison with intact group (grey bars). **/*, $p < 0.05/0.01$ in comparison with intact group. Thin/thick bars, $p < 0.05/0.01$ between groups immunized by subcutaneous route in withers region and by i.p. route in the same time points.

ние этих АПК в целом совпадало со кинетикой продукции IgE, обусловленной локальным переключением В-лимфоцитов в ткани места попадания аллергена.

Достоверное накопление CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов в подкожной жировой ткани холки наблюдали на 7-е и 21-е сутки после введения низкой дозы антигена ($p = 0,003$ в обоих случаях), при этом на 14-е и 28-е сутки их содержание было также выше, чем в интактной группе, хотя не достоверно ($p = 0,072$ и $p = 0,053$ соответственно) (рис. 4А, табл. 2). В указанные сроки (7-е и 21-е сутки)

наблюдали достоверный подъем содержания не только CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов в целом, но и их субпопуляции, экспрессирующей поверхностный CD206 и относящейся к M2-макрофагам (рис. 4Б, табл. 2). Очевидно приток макрофагов в подкожную жировую ткань осуществлялся двумя «волнами», первая из которых непосредственно предшествовала самому запуску локальной продукции IgE, а вторая – фазе достижения кривой продукции насыщения (из рисунка 1А видно, что достигая максимума на 21-е сутки, продукция специфического IgE у мышей, иммунизирован-

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ И ВЕЛИЧИНА ПАДЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ РАЗРЕШАЮЩЕЙ ДОЗЫ АНТИГЕНА У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ НИЗКОЙ (100 нг) ДОЗОЙ АНТИГЕНА РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ НА РАЗНЫЕ ВРЕМЕННЫЕ СРОКИ

TABLE 1. SPECIFIC ANTIBODY PRODUCTION AND THE MAGNITUDE OF THE FALL IN BODY TEMPERATURE AFTER ADMINISTRATION OF CHALLENGE ANTIGEN DOSE IN MICE IMMUNIZED BY 100 ng OF ANTIGEN BY DIFFERENT ROUTES IN DIFFERENT TIME POINTS

Способ иммунизации Route of immunization	Срок, дни Time, days	Титры IgE, $\times 10^{-3}$ IgE titers, $\times 10^{-3}$	Титры IgG1, $\times 10^{-3}$ IgG1 titers, $\times 10^{-3}$	-dT, °C
Интактные Intact	0	0,021 \pm 0,007	0,14 \pm 0,02	0,0 \pm 0,2
Подкожно, холка Subcutaneous, withers	7	0,019 \pm 0,004 $p_1 = 0,136$ $p_2 = 0,302$	0,112 \pm 0,007 $p_1 = 0,261$ $p_2 = 0,047$	-0,4 \pm 0,1 $p_1 = 0,134$ $p_2 = 0,047$
	14	0,10 \pm 0,02 $p_1 = 0,011$ $p_2 = 0,018$	15 \pm 9 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,018$	0,1 \pm 0,2 $p_1 = 0,323$ $p_2 = 0,149$
	21	0,5 \pm 0,3 $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,030$	15 \pm 10 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,149$	1,4 \pm 0,1 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,024$
	28	0,7 \pm 0,2 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,006$	26 \pm 11 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,006$	1,3 \pm 0,2 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,149$
Интраперитонеально Intraperitoneal	7	0,014 \pm 0,002 $p_1 = 0,291$	0,36 \pm 0,09 $p_1 = 0,264$	0,1 \pm 0,1 $p_1 = 0,117$
	14	0,020 \pm 0,006 $p_1 = 0,5$	0,51 \pm 0,17 $p_1 = 0,264$	0,1 \pm 0,2 $p_1 = 0,206$
	21	0,020 \pm 0,005 $p_1 = 0,429$	4 \pm 2 $p_1 = 0,047$	0,3 \pm 0,3 $p_1 = 0,206$
	28	0,09 \pm 0,02 $p_1 = 0,014$	2,5 \pm 0,2 $p_1 = 0,011$	0,7 \pm 0,4 $p_1 = 0,072$

Примечание. В таблице указаны средние значения и стандартные отклонения. p_1 – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с интактной группой; p_2 – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с интраперитонеально иммунизированными животными на том же сроке иммунизации.

Note. The table shows the means and standard deviations. p_1 , the probability of the null hypothesis when compared with the intact group; p_2 , reliability of the probability of the null hypothesis when compared with intraperitoneally immunized animals at the same time of immunization.

ных в холку, далее не увеличивается). Несмотря то, что у интактных мышей в интраперитонеальном жире содержание CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов было существенно выше, чем в подкожном, при внутрибрюшинной иммунизации не наблюдали изменения их содержания, хотя на 28-е сутки доля CD206⁺CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов возрасла ($p = 0,03$) (рис. 4, табл. 2). Увеличение содержания этих клеток совпадало по времени с запуском продукции IgE у животных при в/б иммунизации.

Продукция антител и накопление тканевых АПК у мышей линии BALB/с, иммунизированных в область холки низкой и высокой дозами антигена

Изучение механизмов формирования аллергического иммунного ответа будет неполным, если не ответить на вопрос, что отличает иммунный

ответ на низкие дозы антигена, стимулирующие продукцию IgE при минимальной продукции IgG₁, от типичного иммунного ответа, формируемого при введении высоких доз антигена. Поэтому в данной работе было также проведено сравнение содержания дендритных клеток в подкожном жире у животных, иммунизированных в область холки низкой (100 нг) и высокой (10 мкг) дозой антигена. Поскольку накопление выше-названных типов АПК наблюдали в основном на 7-е и 21-е сутки, мы сфокусировались именно на этих временных точках.

Результаты, представленные на рисунке 5А, Б и в таблице 3, показывают достоверную продукцию специфического IgE к 21-м суткам только в низкодозовой группе и достоверно более высокую продукцию IgG₁ в высокодозовой группе.

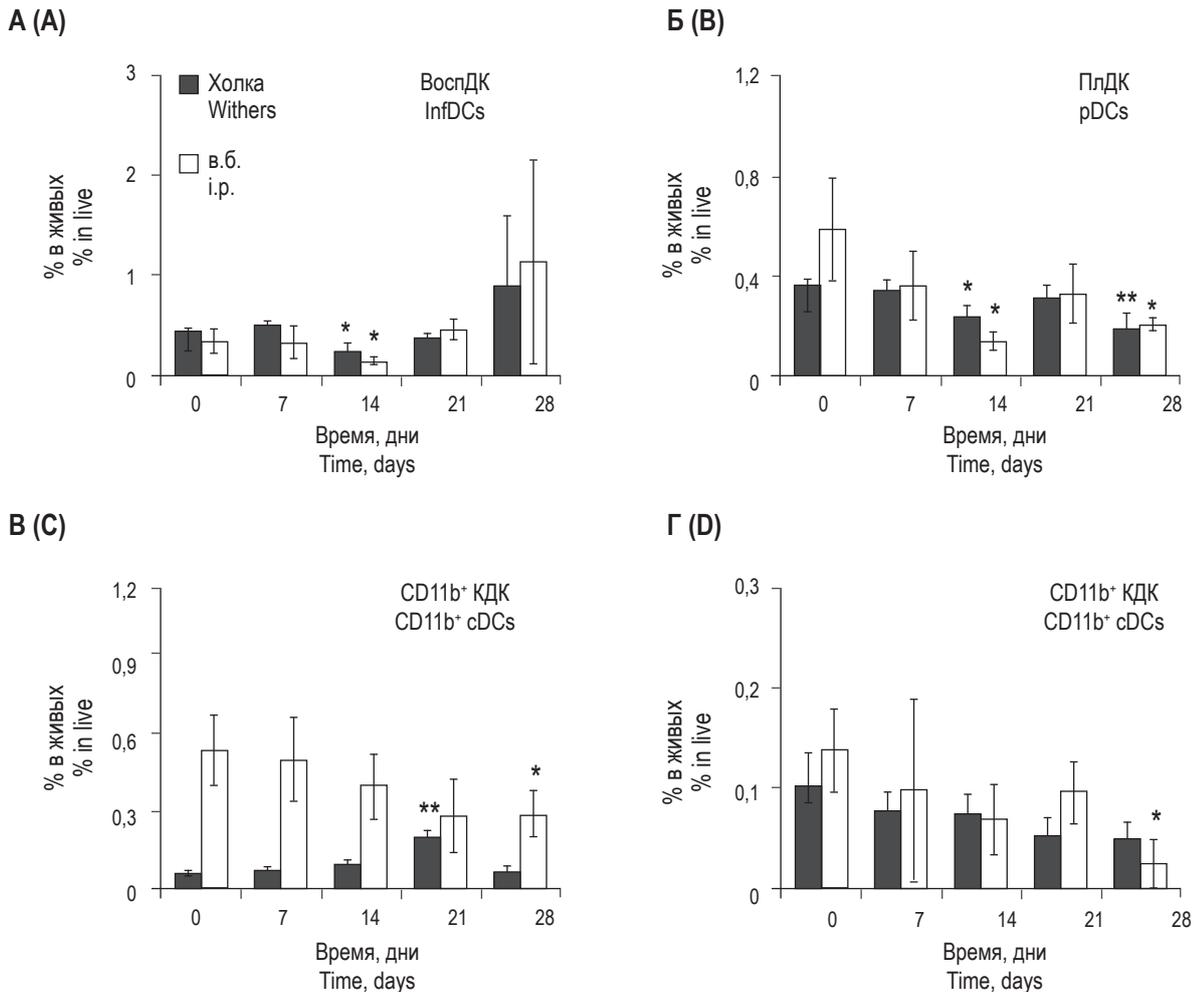


Рисунок 3. Содержание различных субпопуляций дендритных клеток в подкожном жире области холки или интраперитонеальном жире у иммунных мышей

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю в течение 4 недель низкими (100 нг) дозами OVA подкожно в область холки или интраперитонеально. Содержание (% от всех живых единичных клеток в лимфоцитарном гейте) воспалительных (ВоспДК) (А), плазмацитоидных (ПлДК) (Б), CD11b⁺ классических (CD11b⁺ КДК) (В) и CD11b⁻ классических (CD11b⁻ КДК) (Г) дендритных клеток в ткани подкожного жира области холки у мышей, иммунизированных подкожно в область холки («холка», черные столбики), и в ткани интраперитонеального жира у мышей, иммунизированных интраперитонеально («в/б», белые столбики) на разные сроки иммунизации. */** – $p < 0,05/0,01$ в сравнении с интактной группой.

Figure 3. Content of various subpopulations of dendritic cells in the subcutaneous fat of the withers or intraperitoneal fat in immune mice

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week for 4 weeks with low (100 ng) doses of OVA subcutaneously in the withers or intraperitoneally. Content (% of all life cells in lymphocyte gate) of inflammatory (InfDCs) (A), plasmacytoid (pDCs) (B), CD11b⁺ classical (CD11b⁺ cDCs) (C) or CD11b⁻ classical (CD11b⁻ cDCs) (D) in subcutaneous adipose tissue in mice, immunized by subcutaneous route in withers region (“withers”, black bars) or in intraperitoneal fat in mice immunized by i.p. route (“i.p.”, white bars) in different time points. */**, $p < 0.05/0.01$ in comparison with intact group.

Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее.

На 7-е сутки, непосредственно перед началом продукции специфического IgE, содержание макрофагов в целом, воспалительных, плазмацитоидных и CD11b⁻ классических дендритных клеток в подкожном жире области холки не различалось у мышей, иммунизированных разными дозами антигена (рис. 5В, Г, Е, Ж, табл. 4). В то же время

содержание CD11b⁺ классических дендритных клеток было достоверно выше у мышей, иммунизированных высокой дозой антигена, а содержание CD206⁺ макрофагов было ниже (рис. 5Д, 3, табл. 4). Поскольку продукция IgE формируется быстрее при иммунизации низкими дозами антигена, участие M2-макрофагов индукции специфического гуморального ответа на низкие дозы может быть, таким образом, более суще-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ (В % ОТ ВСЕХ ЖИВЫХ КЛЕТОК) В ПОДКОЖНОМ ЖИРЕ ОБЛАСТИ ХОЛКИ И В ЖИРОВОЙ ТКАНИ БРЮШИНЫ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК – ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ (ВоспДК), ПЛАЗМАЦИТОИДНЫХ (ПлДК), CD11b⁺ И CD11b⁻ КЛАССИЧЕСКИХ ДЕНДРИТНЫХ (КДК), МАКРОФАГОВ (МФ) В ЦЕЛОМ И CD206⁺ M2-МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ НИЗКИМИ ДОЗАМИ АНТИГЕНА, СООТВЕТСТВЕННО, ПОДКОЖНО В ОБЛАСТЬ ХОЛКИ ИЛИ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНО

TABLE 2. % OF DIFFERENT ANTIGEN-PRESENTING CELLS SUBPOPULATIONS – INFLAMMATORY (InfDCs), PLASMACYTOID (pDCs), CD11b⁺ AND CD11b⁻ CLASSICAL DENDRITIC CELLS (CDCs), MACROPHAGES (MφS) AND CD206⁺ M2 MACROPHAGES IN ALL LIFE CELLS IN SUBCUTANEOUS WITHERS ADIPOSE TISSUE OR INTRAPERITONEAL ADIPOSE TISSUE IN MICE AFTER IMMUNIZATION BY LOW ANTIGEN DOSES SUBCUTANEOUSLY IN WITHERS OR BY INTRAPERITONEAL ROUTE

Способ иммунизации, жировая ткань Immunization route, adipose tissue	Срок, дни Time, days	ВоспДК, % InfDCs	ПлДК, % pDCs	CD11b ⁺ КДК, % CD11b ⁺ cDCs	CD11b ⁻ КДК, % CD11b ⁻ cDCs	МФ, %	CD206 ⁺ МФ, %
Интактные, жир области холки Intact, withers adipose tissue	0	0,43±0,05	0,36±0,03	0,07±0,02	0,10±0,03	1,15±0,19	0,25±0,04
Подкожно, холка, жировая ткань области холки Subcutaneous, withers adipose tissue	7	0,51±0,05 p ₁ = 0,072	0,34±0,05 p ₁ = 0,374	0,07±0,02 p ₁ = 0,5	0,08±0,02 p ₁ = 0,284	4±2 p ₁ = 0,003	0,4±0,1 p ₁ = 0,011
	14	0,25±0,07 p ₁ = 0,026	0,24±0,05 p ₁ = 0,017	0,10±0,02 p ₁ = 0,053	0,08±0,02 p ₁ = 0,312	1,9±0,7 p ₁ = 0,072	0,35±0,18 p ₁ = 0,5
	21	0,37±0,05 p ₁ = 0,209	0,31±0,05 p ₁ = 0,096	0,20±0,03 p ₁ = 0,003	0,05±0,02 p ₁ = 0,127	6,0±1,0 p ₁ = 0,003	0,92±0,17 p ₁ = 0,003
	28	0,9±0,7 p ₁ = 0,312	0,19±0,06 p ₁ = 0,003	0,07±0,03 p ₁ = 0,312	0,05±0,02 p ₁ = 0,166	2,2±1,1 p ₁ = 0,053	0,6±0,3 p ₁ = 0,053
Интактные, интраперитонеальный жир Intact, Intra-peritoneal fat	0	0,35±0,12	0,6±0,2	0,53±0,13	0,14±0,04	12±3	1,2±0,5
Интраперитонеально, интраперитонеальный жир Intra-peritoneal, intra-peritoneal fat	7	0,33±0,17 p ₁ = 0,053	0,36±0,14 p ₁ = 0,200	0,50±0,15 p ₁ = 0,337	0,10±0,09 p ₁ = 0,106	11±6 p ₁ = 0,417	1,4±0,8 p ₁ = 0,500
	14	0,15±0,03 p ₁ = 0,003	0,15±0,04 p ₁ = 0,011	0,40±0,13 p ₁ = 0,106	0,07±0,03 p ₁ = 0,106	16±4 p ₁ = 0,264	1,3±0,2 p ₁ = 0,149
	21	0,46±0,10 p ₁ = 0,312	0,33±0,12 p ₁ = 0,106	0,29±0,14 p ₁ = 0,149	0,10±0,03 p ₁ = 0,072	7±4 p ₁ = 0,072	2,0±1,0 p ₁ = 0,337
	28	1,1±1,0 p ₁ = 0,312	0,21±0,03 p ₁ = 0,018	0,29±0,09 p ₁ = 0,03	0,02±0,02 p ₁ = 0,018	15±3 p ₁ = 0,264	2,5±0,3 p ₁ = 0,030

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for table 1.

ственным, чем CD11b⁺ классических дендритных клеток. Это подтверждается тем, что содержание как макрофагов в целом, так и M2 CD206⁺ макрофагов было достоверно выше в подкожном жире у мышей, иммунизированных низкими дозами в сравнении с высокодозовой группой, и на 21-е сутки, в срок, когда кинетическая зависимость титров IgE-достигала плато (рис. 2А, 5Ж, 3, табл. 4).

Кроме того, хотя содержание воспалительных дендритных клеток у мышей, иммунизированных низкой дозой антигена, не повышалось в сравнении с интактной группой, но на 21-е сутки оно было также достоверно выше, чем в высокодозовой группе (рис. 5В, табл. 4). В случае CD11b⁻ классических дендритных клеток тенденции были обратные (рис. 5Е, табл. 4). Содержание CD11b⁺ классических и плазмацитоидных

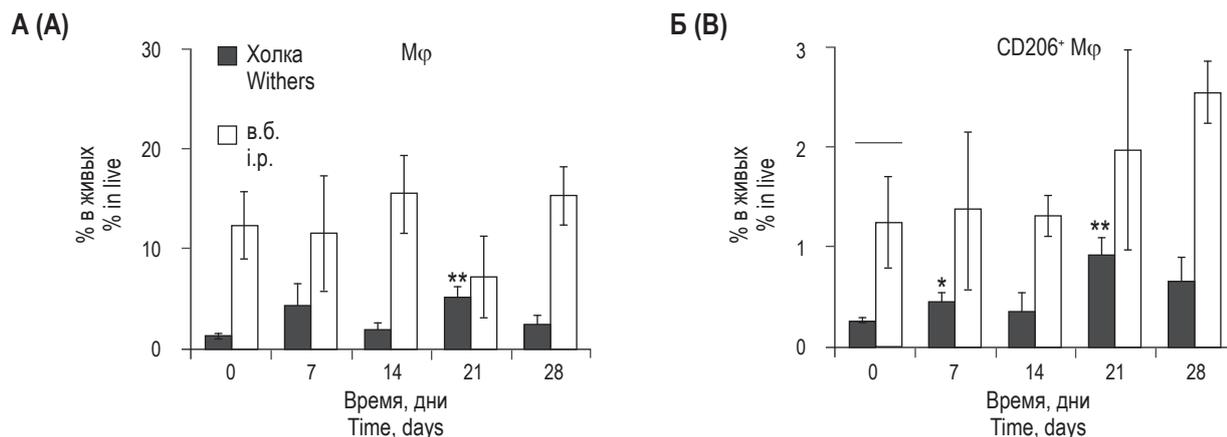


Рисунок 4. Содержание макрофагов в целом и M2-макрофагов в подкожном жире области холки или интраперитонеальном жире у иммунных мышей

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю в течение 4 недель низкими (100 нг) дозами OVA подкожно в область холки или внутривенно. Содержание (% от всех живых единичных клеток в лимфоцитарном гейте) макрофагов (Mφ) в целом (А) и CD206⁺ макрофагов M2-фенотипа (CD206⁺ Mφ) (Б) в ткани подкожного жира области холки у мышей, иммунизированных подкожно в область холки («холка», черные столбики), и в ткани интраперитонеального жира у мышей, иммунизированных интраперитонеально («в/б», белые столбики) на разные сроки иммунизации. */** – p < 0,05/0,01 в сравнении с интактной группой.

Figure 4. Content of all macrophages and M2 macrophages in subcutaneous withers adipose tissue or in intraperitoneal fat tissue in immune mice

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week for 4 weeks with low (100 ng) doses of OVA subcutaneously in the withers or intraperitoneally. Content (% of all live cells in lymphocyte gate) of all macrophages (Mφ) (A) or M2 macrophages (CD206⁺ Mφ) (B) in subcutaneous adipose tissue in withers region tissue in mice, immunized by subcutaneous route in withers region ("withers", black bars) or in intraperitoneal fat in mice immunized by i.p. route ("i.p.", white bars) in different time points. */**, p < 0.05/0.01 in comparison with intact group.

ТАБЛИЦА 3. ПРОДУКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ НИЗКОЙ (100 нг) ИЛИ ВЫСОКОЙ (10 мкг) ДОЗОЙ АНТИГЕНА ПОДКОЖНО В ОБЛАСТЬ ХОЛКИ НА РАЗНЫЕ ВРЕМЕННЫЕ СРОКИ

TABLE 3. SPECIFIC ANTIBODY PRODUCTION IN MICE AFTER IMMUNIZATION BY LOW (100 ng) AND HIGH (10 μg) ANTIGEN DOSES SUBCUTANEOUSLY IN WITHERS REGION IN DIFFERENT TIME POINTS

Доза антигена Antigen doses	Срок, дни Time, days	Титры IgE, × 10 ⁻³ IgE titers, × 10 ⁻³	Титры IgG1, × 10 ⁻³ IgG1 titers, × 10 ⁻³
Интактные Intact	0	0,020±0,009	0,11±0,03
100 нг 100 ng	7	0,020±0,005 p ₁ = 0,464 p ₂ = 0,264	0,110±0,005 p ₁ = 0,323 p ₂ = 0,200
	21	0,6±0,3 p ₁ = 0,022 p ₂ = 0,072	13±10 p ₁ = 0,004 p ₂ = 0,006
10 мкг (10000 нг) 10 μg (10000 ng)	7	0,014±0,002 p ₁ = 0,464	1,4±0,7 p ₁ = 0,061
	21	0,10±0,04 p ₁ = 0,085	800±300 p ₁ = 0,004

Примечание. В таблице указаны средние значения и стандартные отклонения. p₁ – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с интактной группой; p₂ – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с животными, иммунизированными высокой дозой, на том же сроке иммунизации.

Note. The table shows the means and standard deviations. p₁, the probability of the null hypothesis when compared with the intact group; p₂, reliability of the probability of the null hypothesis when compared with high dose immunized animals at the same time of immunization.

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ (В % ОТ ВСЕХ ЖИВЫХ КЛЕТОК) В ПОДКОЖНОМ ЖИРЕ ОБЛАСТИ ХОЛКИ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК – ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ (ВоспДК), ПЛАЗМАЦИТОИДНЫХ (ПлДК), CD11b⁺ И CD11b⁻ КЛАССИЧЕСКИХ (КДК), МАКРОФАГОВ (МФ) В ЦЕЛОМ И CD206⁺ М2-МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ НИЗКИМИ (100 нг) ИЛИ ВЫСОКИМИ (10 мкг) ДОЗАМИ АНТИГЕНА ПОДКОЖНО В ОБЛАСТЬ ХОЛКИ НА РАЗНЫЕ СРОКИ

TABLE 4. % OF DIFFERENT ANTIGEN-PRESENTING CELLS SUBPOPULATIONS – INFLAMMATORY (InfDCs), PLASMACYTOID (pDCs), CD11b⁺ AND CD11b⁻ CLASSICAL DENDRITIC CELLS (cDCs), MACROPHAGES (Mφs) AND CD206⁺ M2 MACROPHAGES IN ALL LIFE CELLS IN SUBCUTANEOUS WITHERS ADIPOSE TISSUE IN MICE AFTER IMMUNIZATION BY LOW OR HIGH ANTIGEN DOSES SUBCUTANEOUSLY IN WITHERS OR BY INTRAPERITONEAL ROUTE

Доза антигена Antigen dose	Срок, дни Time, days	ВоспДК, % InfDCs, %	ПлДК, % pDCs, %	CD11b ⁺ КДК, % CD11b ⁺ cDCs, %	CD11b ⁻ КДК, % CD11b ⁻ cDCs, %	Мφ, %	CD206 ⁺ Мφ
Интактные Intact	0	0,40±0,05	0,38±0,04	0,07±0,03	0,10±0,04	1,23±0,18	0,25±0,04
100 нг 100 ng	7	0,49±0,04 p ₁ = 0,053 p ₂ = 0,378	0,34±0,04 p ₁ = 0,209 p ₂ = 0,500	0,07±0,02 p ₁ = 0,436 p ₂ = 0,011	0,07±0,02 p ₁ = 0,166 p ₂ = 0,417	4±2 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,149	0,41±0,09 p ₁ = 0,017 p ₂ = 0,011
	21	0,35±0,04 p ₁ = 0,258 p ₂ = 0,018	0,32±0,04 p ₁ = 0,127 p ₂ = 0,417	0,21±0,02 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,200	0,05±0,02 p ₁ = 0,209 p ₂ = 0,018	5,0±0,8 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,006	0,91±0,15 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,047
10000 нг 10000 ng	7	0,50±0,05 p ₁ = 0,072	0,28±0,10 p ₁ = 0,097	0,12±0,02 p ₁ = 0,017	0,03±0,02 p ₁ = 0,017	5,5±1,8 p ₁ = 0,003	0,28±0,09 p ₁ = 0,500
	21	0,13±0,06 p ₁ = 0,005	0,27±0,06 p ₁ = 0,036	0,10±0,03 p ₁ = 0,084	0,18±0,05 p ₁ = 0,127	0,70±0,11 p ₁ = 0,053	0,32±0,03 p ₁ = 0,053

Примечание. См. примечание к таблице 3.

Note. As for Table 3.

дендритных клеток достоверно не различалось (рис. 5Г, Д, табл. 4).

Обсуждение

Вопрос о роли различных типов АПК в презентации антигена, активации Т-клеток и продукции антител на ранних стадиях формирования IgE-зависимых патологий активно изучался [1, 2, 4, 5, 9, 13, 16, 23]. Однако специфика данных процессов в условиях введения низких доз антигена, индуцирующих более селективное формирование продукции IgE, а также в условиях попадания аллергена через подкожную жировую клетчатку, содержащую ТАЛК, оставалась малоизученной. В данной работе методом многоканальной проточной цитометрии был проведен анализ содержания различных субпопуляций АПК в жировой ткани в месте попадания антигена и был сделан первый важный шаг к пониманию данных процессов.

Согласно имеющимся литературным данным, в траффике антигена при его попадании за барьер участвуют в основном CD11b⁺ классические дендритные клетки и в меньшей мере воспалительные дендритные клетки [23]. CD11b⁻ классических плазмацитоидных дендритных клеток предпо-

ложительно тормозят аллергический иммунный ответ [18, 25]. Имеются данные о важной роли макрофагов в модулировании реакции иммунной системы на аллерген/антиген [3, 16], а в ряде работ утверждается способность В-лимфоцитов осуществлять процессинг антигена [13] и даже его транспорт на ранних стадиях и независимо от прочих АПК [27].

Данные о накоплении CD11b⁺ классических дендритных клеток преимущественно в жировой ткани области холки при низкодозовой иммунизации, сопровождающейся формированием проанафилактических IgE антител, совпадают с общепринятой точкой зрения о ведущей роли данных клеток в траффике и презентации попадающих за барьер белков-аллергенов [12, 23, 25]. В то же время важным фактором может являться не только абсолютное количество таких АПК, а соотношение CD11b⁺ и CD11b⁻ классических дендритных клеток, активирующих разные типы иммунного ответа. Действительно, хотя в интраперитонеальной жировой ткани появление небольшой поздней продукции специфических IgE совпадало с достоверным снижением содержания обоих субпопуляций классических дендритных клеток, доля CD11b⁺ классических снижалась лишь вдвое, в то время как доля CD11b⁻ – в пять раз (рис. 3).

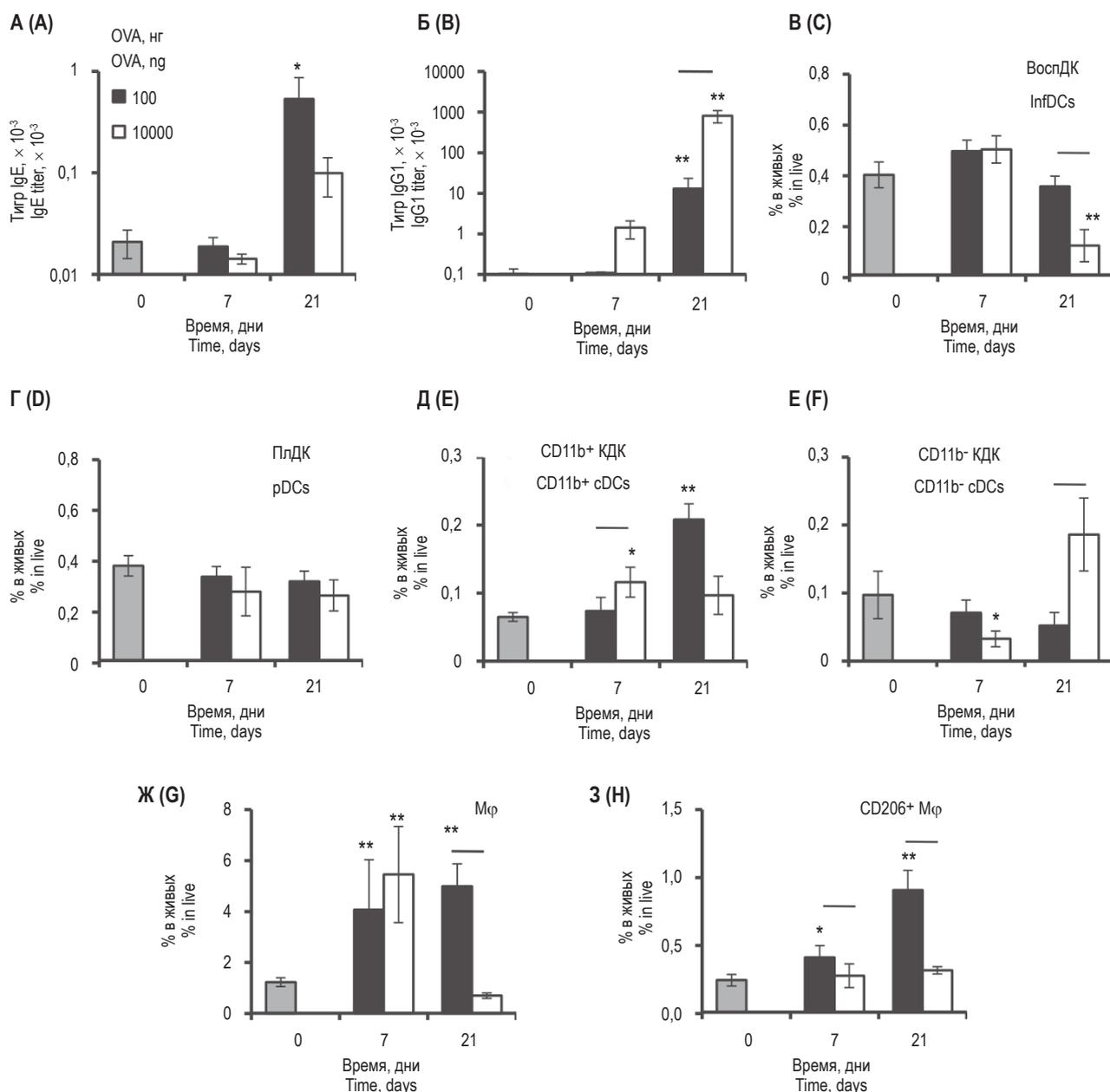


Рисунок 5. Продукция антител и содержание антигенпрезентирующих клеток в подкожном жире области холки у мышей, иммунизированных низкими и высокими дозами антигена

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю низкими (100 нг, черные столбики) или высокими (10000 нг, белые столбики) дозами OVA подкожно в область холки. Продукция специфических IgE (А) и IgG₁ (Б) после 7-го и 21-го дня иммунизации в сравнении с интактной группой (серые столбики), а также содержание (% от всех живых единичных клеток в лимфоцитарном гейте) воспалительных (ВоспДК) (В), плазмацитоидных (ПлДК) (Г), CD11b⁺ классических (CD11b⁺ КДК) (Д) и CD11b⁻ классических (CD11b⁻ КДК) (Е) дендритных клеток, макрофагов в целом (Мф) (Ж) и CD206⁺ макрофагов M2-фенотипа (CD206⁺ Мф) (З) в ткани подкожного жира области холки у мышей на разные сроки иммунизации. */** – $p < 0,05/0,01$ в сравнении с интактной группой. Тонкие / толстые планки – $p < 0,05/0,01$ при сравнении групп, иммунизированных низкой и высокой дозами OVA на один и тот же срок.

Figure 5. Antibody production and content of antigen-presenting cells in the subcutaneous fat of the withers in mice immunized with low and high doses of antigen

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week by low (100 ng, black bars) or high (10000 ng, white bars) OVA doses subcutaneous in withers. Specific IgE (A) and IgG₁ (B) antibody production after 7th and 21th day of immunization in comparison with intact group (grey bars) as well as content (% of all life single cells in lymphocyte gate) of inflammatory (InfDCs) (C), plasmacytoid (pDCs) (D), CD11b⁺ classical (CD11b⁺ cDCs) (E) or CD11b⁻ classical (CD11b⁻ cDCs) dendritic cells (F), macrophages (Mφ) (G) and CD206⁺ M2 macrophages (CD206⁺ Mφ) (H) in subcutaneous adipose tissue in different time points. */**, $p < 0.05/0.01$ in comparison with intact group. Thin / thick bars, $p < 0.05/0.01$ between groups immunized by low and high antigen doses in the same time points.

Хотя принято считать, что макрофаги хуже, чем дендритные клетки, проявляют себя в качестве первичных АПК, они могут служить источниками провоспалительных цитокинов [2, 3, 10] либо, напротив, в случае М2-субпопуляции, секретировать ферменты, отвечающие за ремоделирование внеклеточного матрикса, облегчая миграцию иммунных клеток в ткани, и в то же время противовоспалительные цитокины, блокирующие развитие Т-хелперов [10]. В одной из работ было показано, что такие макрофаги в большей степени ингибируют формирование Th1, чем Th2 [22]. Таким образом, М2-макрофаги в некоторых случаях являются индикаторами локальной поляризации иммунного ответа в сторону 2-го типа и способствуют его поддержанию. В нашем случае данная точка зрения находит подтверждение в том, что рост содержания не только макрофагов в целом, но и CD206⁺ М2-макрофагов в частности, отмеченный на 7-е сутки протокола, предшествовал моменту возникновения первой продукции IgE. На более поздних сроках высокое содержание макрофагов в целом и М2-макрофагов в частности наблюдалось именно у мышей, иммунизированных низкими, но не высокими, дозами антигена. В то же время накопление CD11b⁺ классических дендритных клеток при введении высоких доз антигена наблюдали даже раньше, чем при введении низких доз (рис. 4, 5).

Таким образом, в формировании и поддержании специфического профиля гуморального иммунного ответа на низкие дозы антигена в области, богатой ТАЛК, именно макрофаги могут играть существенную роль. Поскольку макрофаги в качестве первичных АПК работают менее эффективно, чем дендритные клетки [20], надо полагать, что основные этапы презентации антигена в нашей модельной системе происходят с участием CD11b⁺ классических дендритных клеток. Роль макрофагов в нашей модели аллергии может заключаться в опосредованном влиянии на процесс презентации антигена, в создании благоприятного «цитокинового» фона для формирования локальной продукции специфического IgE. Поскольку макрофаги несут на своей поверхности Fc-рецепторы [10, 20], несмотря на их более слабую активность в качестве клеток, процессирующих антиген, они могли транспортировать его из места попадания в близлежащие ТАЛК, содержащие В-лимфоциты, на своей поверхности в составе иммунных комплексов, и работать как «депо» для поступающего в низких дозах антигена. Последнее предположение менее вероятно, поскольку в данном случае большую бы роль играло общее содержание макрофагов в ткани, а не сама их активация с последующим накоплением в сайте воспаления под действием факторов воспаления (аларминов, цитокинов и хемокинов), и поскольку

ку содержание макрофагов у интактных мышей было больше в интраперитонеальном жире, чем в подкожном, то именно интраперитонеальное введение антигена должно было бы индуцировать более интенсивный IgE-ответ.

В дальнейшем планируется изучение факторов, обуславливающих приток моноцитов/макрофагов в сайты введения антигена, а также определение спектра продуцируемых ими цитокинов.

Заключение

В настоящей работе исследования были выполнены на клинически релевантной модели аллергии на лабораторных животных, подразумевающей протокол индукции высокой продукции IgE при минимальной сопутствующей продукции IgG₁, для чего животным в низких дозах вводили антиген подкожно в область холки, богатую ТАЛК, связанными с жировой тканью. Было установлено, что в такой системе наиболее вероятно в качестве первичных АПК могут выступать CD11b⁺ классические дендритные клетки. При этом накопление CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов, в том числе их CD206⁺ субпопуляции (М2-макрофаги) также является специфической чертой формируемого при этом локального иммунного ответа.

Благодарности

Авторы выражают благодарность к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН Свирщевой Е.В. за помощь в организации процесса экспериментальной работы, а также м.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий Вавиловой Ю.Д. за помощь в настройке проточного цитометра.

Информация о вкладе авторов и иных лиц

Чудаков Д.Б. — планирование эксперимента; получение финансирования; взятие материала от животных; постановка иммуно-ферментного анализа; постановка проточной цитометрии; обработка результатов; написание рукописи.

Коновалова М.В. — содержание животных; иммунизация животных.

Коцарева О.Д. — постановка иммуноферментного анализа.

Шевченко М.А. — статистическая обработка данных.

Стрельцова М.А. — помощь в постановке проточной цитометрии, первичная настройка прибора.

Сергеев А.А. — помощь в обработке данных, оформление иллюстраций и таблиц.

Фаттахова Г.В. — окончательный анализ данных; редактирование рукописи, подготовка окончательного варианта рукописи.

Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи до публикации.

Список литературы / References

1. Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Елисеева Т.И. Современный взгляд на развитие и подходы к терапии атопического дерматита у детей // Фарматека, 2020. Т. 27, № 1. С. 20-27. [Balabolkin I.I., Bulgakova V.A., Eliseeva T.I. A modern view on the development and approaches to the treatment of atopic dermatitis in children. *Farmateka = Pharmateka*, 2020, Vol. 27, no. 1, pp. 20-27. (In Russ.)]
2. Губернаторова Е.О., Намаканова О.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Клеточные источники ИЛ-6 в патогенезе острой аллергической астмы // Аллергология и иммунология, 2018. Т. 19, № 2. С. 115. [Gubernatorova E.O., Namakanova O.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Cellular sources of IL-6 in the pathogenesis of acute allergic asthma. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2018, Vol. 19, no. 2, p. 115. (In Russ.)]
3. Елисютина О.Г., Феденко Е.С., Болдырева М.Н., Гудима Г.О. Особенности иммунного ответа и роль некоторых цитокинов при атопическом дерматите // Российский аллергологический журнал, 2015. № 1. С. 3-14. [Elisyutina O.G., Fedenko E.S., Boldyreva M.N., Gudima G.O. Features of the immune response and the role of some cytokines in atopic dermatitis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2015, Vol. 1, pp 3-14. (In Russ.)]
4. Кайбышева В.О., Михалева Л.М., Никонов Е.Л., Шаповальянц С.Г. Эпидемиология, этиология и патогенез эозинофильного эзофагита. Новейшие данные // Доказательная гастроэнтерология, 2019. Т. 8, № 2. С. 50-72. [Kaibysheva V.O., Mikhalyova L.M., Nikonov E.L., Shapovalyantz S.G. Epidemiology, etiology and pathogenesis of eosinophilic esophagitis. Latest data. *Dokazatelnaya gastroenterologiya = Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*, 2019, Vol. 8, no. 2, pp. 50-72. (In Russ.)]
5. Сидоренко Е.В., Выхристенко Л.Р. Фенотип-ориентированная иммунотерапия бронхиальной астмы // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2018. № 3. С. 60-68. [Sidorenko E.V., Vykhristenko L.R. Phenomenon-oriented immunotherapy for bronchial asthma. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology and Infectology*, 2018, no. 3, pp. 60-68. (In Russ.)]
6. Хаитов М.Р., Гайсина А.Р., Шиловский И.П., Смирнов В.В., Раменская Г.В., Никонова А.А., Хаитов Р.М. Роль интерлейкина 33 в патогенезе бронхиальной астмы. Новые экспериментальные данные // Биохимия, 2018. Т. 83, № 1. С. 19-33. [Khaitov M.R., Gaisina A.R., Shilovsky I.P., Smirnov V.V., Ramenskaya G.V., Nikonova A.A., Khaitov R.M. The role of interleukin 33 in the pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2018, Vol. 83, no. 1, pp. 19-33. (In Russ.)]
7. Чудаков Д.Б., Рязанцев Д.Ю., Каширина Е.И., Бержец В.М., Свирщевская Е.В. Роль дозы аллергена в индукции у мышей IgE антител на белки из клещей домашней пыли // Иммунология, 2014. Т. 35, № 6. С. 321-328. [Chudakov D.B., Rysantsev D.Yu., Kashirina E.I., Berzhets V.M., Svirshevskaya E.V. The role of allergen dose in the induction in mice of IgE antibodies to proteins from house dust mites. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 321-328. (In Russ.)]
8. Alessandrini F., Musiol S., Schneider E., Blanco-Perez M., Albrecht M. Mimicking antigen-driven asthma in rodent models – how close can we get? *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575936. doi: 10.3389/fimmu.2020.575936.
9. Balbo P., Silvestri M., Rossi G.A., Crimi E., Burastero S.E. Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 2001, Vol. 31, no. 4, pp. 625-636.
10. Chávez-Galán L., Olleros M.L., Vesin D., Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169⁺ and TCR⁺ Macrophages. *Front Immunol.* 2015, Vol. 6, 263. doi: 10.3389/fimmu.2015.00263.
11. Chudakov D.B., Rysantsev D.Yu., Tsaregorodtseva D.S., Kotsareva O.D., Fattakhova G.V., Svirshevskaya E.V. Tertiary lymphoid structure related B-cell IgE isotype switching and secondary lymphoid organ linked IgE production in mouse allergy model. *BMC Immunol.*, 2020, Vol. 21, 45. doi: 10.1186/s12865-020-00376-7.
12. Constant S.L., Brogdon J.L., Piggott D.A., Herrick C.A., Visintin I., Ruddle N.H., Bottomly K. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation *in situ*. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, no. 10, pp. 1441-1448.
13. Dullaers M., Schuijs M.J., Willart M., Fierens K., van Moorleghem J., Hammad H., Lambrecht B.N. House dust mite-driven asthma and allergen-specific T cells depend on B cells when the amount of inhaled allergen is limiting. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 140, no. 1, pp. 76-88.
14. Frasca D., Diaz A., Romero M., Thaller S., Blomberg B.B. Secretion of autoimmune antibodies in the human subcutaneous adipose tissue. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 5, e0197472. doi: 10.1371/journal.pone.0197472.
15. Kawakami Y., Sielski R., Kawakami T. Mouse body temperature measurement using infrared thermometer during passive systemic anaphylaxis and food allergy evaluation. *J. Vis. Exp.*, 2018, Vol. 14, 58391. doi: 10.3791/58391.
16. Marichal T., Ohata K., Bedoret D., Mesnil C., Sabatel C., Kobiyama K., Lekeux P., Coban C., Akira S., Ishii K.J., Bureau F., Desmet C.J. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, pp. 996-1002.
17. McDonnell M.E., Ganley-Leal L.M., Mehta A., Bigornia S.J., Mott M., Rehman Q., Farb M.G., Hess D.T., Joseph L., Gokce N., Apovian C.M. B lymphocytes in human subcutaneous adipose crown-like structures. *Obesity (Silver Spring)*, 2012, Vol. 20, no. 7, pp. 1372-1378.

18. Merad M., Sathe P., Helft J., Meller J., Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 563-604.
19. Morris D.L., Cho K.W., Delproposto J.L., Oatmen K.E., Geletka L.M., Martinez-Santibanez G., Singer K., Lumeng C.N. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4⁺ T cells in mice. *Diabetes*, 2013, Vol. 62, no. 8, pp. 2762-2772.
20. Murphy K.P. *Janeway's immunobiology*. 6th ed. New York: Garland Science, 2011.
21. Niedenberger V., Niggemann B., Kraft D., Spitzauer S., Valenta R. Evolution of IgM, IgE and IgG (1-4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur. J. Immunol.*, 2002, Vol. 32, no. 2, pp. 576-584.
22. Oishi S., Takano R., Tamura S., Tani S., Iwaizumi M., Hamaya Y., Takagaki K., Nagata T., Seto S., Horii T., Osawa S., Furuta T., Miyajima H., Sugimoto K. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology*, 2016, Vol. 149, no. 3, pp. 320-328.
23. Plantinga M., Guilliams M., Vanheerswynghels M., Deswarte K., Branco-Madeira F., Toussaint W., Vanhoutte L., Neyt K., Killeen N., Malissen B., Hammad H., Lambrecht B.N. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 2, pp. 322-335.
24. Poulsen L.K., Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann. Med.*, 2007, Vol. 39, no. 6, pp. 440-456.
25. Schlitzer A., Ginhoux F. Organization of the mouse and human DC network. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, pp. 90-99.

Авторы:

Чудаков Д.Б. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Коновалова М.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Коцарева О.Д. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Шевченко М.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Стрельцова М.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Сергеев А.А. — аспирант лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Фаттахова Г.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Chudakov D.B., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Konovalova M.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kotsareva O.D., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Shevchenko M.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Streltsova M.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Sergeev A.A., Postgraduated Student, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Fattakhova G.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ И СОСТОЯНИЯ МАЛЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ЛЕГКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ С ОЖИРЕНИЕМ

Юренко А.В., Антонюк М.В., Минеева Е.Е., Ходосова К.К.

*Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения –
Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания,
г. Владивосток, Россия*

Резюме. Цель исследования – установить взаимосвязи между уровнем цитокинов в сыворотке крови и показателями легочной функции; выделение маркеров развития дисфункции малых дыхательных путей у больных легкой бронхиальной астмой частично контролируемого течения с ожирением.

Обследовано 53 пациента с легкой бронхиальной астмой частично контролируемого течения с ожирением I-II степени. Группу контроля составили 25 здоровых добровольцев. Всем участникам проводили спирометрию, бодиплетизмографию, в сыворотке крови определяли фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерферон гамма (IFN γ), интерлейкины (IL) IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A.

У пациентов с бронхиальной астмой легкой степени тяжести частично контролируемого течения независимо от массы тела выявлено увеличение IL-17A на 55,8% и IL-4 на 44,9%. По результатам кластерного анализа выделено две группы в зависимости от состояния малых дыхательных путей и уровня про- и противовоспалительных цитокинов. Показано, что дисфункция малых дыхательных путей сопровождается гиперцитокинемией и чаще диагностируется при бронхиальной астме с преобладанием Th1- и Th17-иммунного ответа. Выявлена ассоциация IL-17A, IL-6 с показателями, отражающими состояние малых дыхательных путей, IFN γ с показателями, указывающими на наличие обструкции.

При легкой бронхиальной астме с ожирением выявлены особенности легочной функции в зависимости от цитокинового статуса. Выделено два иммуно-функциональных варианта, отличающиеся активностью системного воспаления, типом иммунного ответа и состоянием малых дыхательных путей. Выявленные взаимосвязи позволяют рассматривать IL-17A, IL-6 и IFN γ как маркеры дисфункции малых дыхательных путей при легкой бронхиальной астме частично контролируемого течения, ассоциированной с ожирением.

Ключевые слова: бронхиальная астма, ожирение, цитокины, малые дыхательные пути

Адрес для переписки:

Юренко Алла Валентиновна
Научно-исследовательский институт медицинской
климатологии и восстановительного лечения
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 73г.
Тел./факс: 8 (423) 278-82-01.
E-mail: yurenko_ally@mail.ru

Address for correspondence:

Alla V. Yurenko
Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation
Treatment
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 73g.
Phone/fax: +7 (423) 278-82-01.
E-mail: yurenko_ally@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Юренко, М.В. Антонюк, Е.Е. Минеева, К.К. Ходосова «Патофизиологическая взаимосвязь системного воспаления и состояния малых дыхательных путей при легкой бронхиальной астме с ожирением» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1205-1218.
doi: 10.15789/1563-0625-PRB-2388

© Юренко А.В. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Yurenko, M.V. Antonyuk, E.E. Mineeva, K.K. Khodosova
“Pathophysiological relation between the systemic inflammation
and the state of small airways in mild asthma with obesity”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1205-1218.
doi: 10.15789/1563-0625-PRB-2388

© Yurenko A.V. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PRB-2388

PATHOPHYSIOLOGICAL RELATION BETWEEN THE SYSTEMIC INFLAMMATION AND THE STATE OF SMALL AIRWAYS IN MILD ASTHMA WITH OBESITY

Yurenko A.V., Antonyuk M.V., Mineeva E.E., Khodosova K.K.

Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The aim of present study was to establish the relationship between the level of blood serum cytokines and indexes of pulmonary function as well as to identify the markers of evolving dysfunction of small airways in obese patients with partially controlled mild bronchial asthma.

We have examined 53 patients with mild asthma of partially controlled clinical course complicated with obesity (I-II degree). The control group consisted of 25 healthy volunteers. All participants underwent spirometry, bodyplethysmography. Tumor necrosis factor alpha (TNF α), interferon gamma (IFN γ), interleukins (IL) IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A were determined in blood serum.

In the patients with partially controlled mild asthma, an increase in IL-17A by 55.8%, and IL-4 by 44.9% was detected, regardless of body mass. According to the results of cluster analysis, two sub-groups were discerned, depending on the state of the small airways and the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines. The dysfunction of small airways was shown to be accompanied by hypercytokinemia being more common in bronchial asthma with predominant Th1- and Th17-immune responses. We have revealed an association between IL-17A, IL-6 levels and functional indices reflecting the state of the small airways, as well as correlation between IFN γ and the indices of bronchial obstruction.

The features of pulmonary function were found to be dependent on the cytokine status in mild asthma with obesity. Two immuno-functional variants were identified, differing in activity of systemic inflammation, type of immune response, and functional state of the small airways. The revealed relationships allow us to consider IL-17A, IL-6 and IFN γ as markers of small airways dysfunction in mild asthma of partially controlled clinical course associated with obesity.

Keywords: bronchial asthma, obesity, cytokines, small airways

Введение

Недостаточная эффективность лечения существующими методами у части больных бронхиальной астмой (БА) служит поводом для изучения фенотипов БА. Независимо от степени тяжести, в основе всех проявлений БА лежит хроническое воспаление. При этом воспалительный процесс органов дыхания у больных БА неоднороден, и оценка течения заболевания не только по клиническим показателям, но и по биомаркерам как неспецифического, так и специфического воспаления, является достаточно актуальной.

В качестве маркеров, свидетельствующих о наличии, выраженности и характере воспаления дыхательных путей при аллергических заболеваниях, в последнее время используются цитокины, которые участвуют в осуществлении иммунологических и других реакций формирующих различные фенотипы БА [21]. Направленность и механизмы действия цитокинов из-за выраженной плейотропности могут проявляться по-разному, в зависимости от типа иммунного ответа. В раз-

витии БА важная роль отводится дисбалансу Т-клеток, таких как Th1-, Th2-субпопуляций с преобладанием последних. В ряде исследований установлено, что Th2-клетки через массив цитокинов (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25) активизируют воспаление дыхательных путей прямо или косвенно, что наиболее характерно для аллергической БА [20]. В настоящее время показано значение Th17 лимфоцитов в развитии бронхиальной гиперреактивности при некоторых фенотипах БА [9]. Существуют данные о наличии трех фенотипов иммунного ответа при БА: 1) эозинофильного воспаления; 2) аллергической сенсibilизации с наличием антиген-специфического IgE и гиперреактивностью; 3) ремоделирования бронхов [10].

Воспаление воздухоносных путей при БА затрагивает не только центральные, но и дистальные отделы бронхиального дерева – малые дыхательные пути (МДП). В некоторых исследованиях показано, что при астме периферические дыхательные пути являются основной мишенью [11]. Дисфункция МДП выявляется не у всех

пациентов, особенно на ранних стадиях развития заболевания. При этом указанные изменения диагностируются не только на фоне легкой генерализованной бронхиальной обструкции, но и при нормальной легочной функции [5].

На сегодняшний день ведутся активные исследования иммуно-метаболических особенностей развития БА и состояния МДП на фоне избыточной массы тела и ожирения, результаты которых зачастую противоречивы ввиду гетерогенности ее клинических проявлений. При этом отмечается различный фенотип воспаления, в зависимости от массы тела, даже при легкой степени тяжести БА. В ранее проведенных авторами данной статьи исследованиях установлено, что у пациентов при БА легкой степени тяжести частично контролируемого течения при увеличении массы тела и развитии ожирения характер цитокинового дисбаланса свидетельствует о преобладании нейтрофильного типа воспаления [19]. Кроме того, при данном фенотипе БА поражаются не только центральные бронхи, но и МДП, а персистирующее воспаление является одним из факторов, препятствующих достижению контроля над заболеванием [4].

Таким образом, поскольку БА является гетерогенным заболеванием с разнообразными патофизиологическими механизмами, сохраняет актуальность исследование механизмов развития дисфункции МДП и прогнозирование течения заболевания при фенотипе БА, ассоциированной с ожирением.

Цель исследования – установление взаимосвязей между уровнями цитокинов в сыворотке крови и показателями функции внешнего дыхания; выделение маркеров развития дисфункции МДП у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести частично контролируемого течения с ожирением.

Материалы и методы

Исследование осуществлено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации (пересмотр 2013 г.), с одобрения локального Биоэтического комитета и на условиях добровольного информированного согласия.

В исследовании участвовали 53 пациента с БА легкой степени тяжести, частично контролируемого течения с алиментарно-конституциональным ожирением I-II степени. Среди обследованных 15 мужчин и 38 женщин, средний возраст $50,25 \pm 15,08$ лет. Группу контроля составили 25 здоровых добровольцев с нормальной массой тела, без бронхолегочной патологии, сопоставимые по полу и возрасту с обследованными больными.

Критерии включения в исследование: БА легкой степени тяжести, частично контролируемого течения, алиментарно-конституциональное ожирение 1-2-й степени, возраст от 18 до 65 лет.

Критерии исключения из исследования: БА средней и тяжелой степени тяжести, неконтролируемого течения, хроническая обструктивная болезнь легких, профессиональные заболевания бронхолегочной системы, эндокринные заболевания, алиментарно-конституциональное ожирение 3-4-й степени, заболевания внутренних органов в стадии декомпенсации.

Всем пациентам, включенным в исследование, после ознакомления и подписания ими информированного согласия проводилось общепринятое клинико-лабораторное и функциональное обследование в соответствии со стандартом обследования для БА и алиментарно-конституционального ожирения. Диагноз «БА» выставляли в соответствии с рекомендациями GINA, 2020. Для оценки субъективного состояния пациентов, определения уровня контроля над заболеванием использовали тест ACQ-5 (Asthma Control Questionnaire). Количество баллов теста ACQ-5 от 0,75 до 1,5 подтверждало частичный контроль над заболеванием [15].

Исследование функции внешнего дыхания (ФВД) проводили на аппарате Master Screen Body (Германия). По данным спирометрии оценивали жизненную емкость легких (ЖЕЛ), резервный объем выдоха (РОВд.), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁), процентное соотношение ОФВ₁ к ЖЕЛ (ОФВ₁/ЖЕЛ), процентное соотношение ОФВ₁ к ФЖЕЛ (ОФВ₁/ФЖЕЛ), максимальную объемную скорость после выдоха 25% ФЖЕЛ (МОС₇₅), максимальную объемную скорость после выдоха 50% ФЖЕЛ (МОС₅₀), максимальную объемную скорость после выдоха 75% ФЖЕЛ (МОС₂₅), среднюю объемную скорость в интервале выдоха от 25% до 75% ФЖЕЛ (СОС₂₅₋₇₅). Для исследования обратимости обструкции использовали пробу с сальбутамолом (400 мкг). Бронходилатационный тест считается положительным, если после ингаляции короткодействующего бронходилататора коэффициент бронходилатации составляет более 12% и абсолютный прирост – более 200 мл [17]. С помощью бодиплетизмографии оценивали статические легочные объемы и емкости: функциональную остаточную емкость (ФОЕ), остаточный объем легких (ООЛ), общую емкость легких (ОЕЛ), процентное соотношение ООЛ/ОЕЛ и бронхиальное сопротивление на вдохе (Сопр. вд.) и бронхиальное сопротивление на выдохе (Сопр. выд.).

О состоянии МДП судили по показателям бодиплетизмографии (ООЛ, ОЕЛ, ООЛ/ОЕЛ, ФОЕ). Критерием дисфункции МДП по данным бодиплетизмографии принято наличие «воздушных ловушек» (увеличение ООЛ более 140% и доли ООЛ в структуре ОЕЛ – более 125% от должных значений) и признаков гиперинфляции (увеличение ФОЕ более 130% от должного) [4, 17].

Для диагностики алиментарно-конституционного ожирения и определения его степени рассчитывали индекс Кетле (ИК) по формуле (вес(кг)/рост(м)³). Согласно рекомендациям ВОЗ нормальная масса тела (НМТ) диагностируется при значении ИК = 18,9-24,9 кг/м³, избыточная масса тела (ИМТ) – при значении ИК = 25-29,9 кг/м³, ожирение I степени – при значении ИК = 30-34,9 кг/м³, ожирение II степени – при значении ИК = 35-39,9 кг/м³, ожирение III степени – при значении ИК = 40 и более кг/м³ [12].

Цитокиновый профиль оценивали по содержанию в сыворотке крови фактора некроза опухоли- α (TNF α), интерферон- γ (IFN γ), интерлейкинов (IL) IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, определяемых методом проточной цитометрии (тест-систем фирмы BD, США) на цитометре BD FACS Canto II, США). Для обработки данных использовали программу FCAPARRAY 3 (BD, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета статистических программ Statistica 6.1 для Windows. Проверку гипотезы нормальности распределения количественных признаков в группах проводили с помощью критериев Колмогорова–Смирнова, Шапиро–Уилка и критерия согласия Пирсона χ^2 . Deskриптивные статистики в тексте представле-

ны как $M \pm SD$ (при нормальном распределении признака, где M – среднее, SD – стандартное отклонение) и $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$ (при распределении, не соответствующему нормальному, где Me – медиана, $Q_{0,25}$ – нижний квартиль, $Q_{0,75}$ – верхний квартиль). Статистически значимое различие между альтернативными количественными параметрами с распределением, соответствующим нормальному закону, оценивали с помощью t -критерия Стьюдента, в противном случае – с помощью двухвыборочного критерия Уилкоксона, критерия Манна–Уитни, Колмогорова. Исследование взаимосвязи между парами признаков проводилось с помощью критерия корреляции Спирмена (r). Для классификации пациентов на группы применялся кластерный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Клинико-функциональная характеристика пациентов представлена в таблице 1. Показатели ФВД по данным спирометрии у пациентов с БА легкой степени тяжести частично контролируемого течения по сравнению с контрольной группой были снижены: РО выд. на 46% ($p < 0,001$), ОФВ₁ на 13,8% ($p = 0,015$), ОФВ₁/ЖЕЛ на 14,9% ($p < 0,001$), ОФВ₁/ФЖЕЛ на 10% ($p = 0,002$), МОС₇₅ на 26% ($p = 0,003$), МОС₅₀ на 39% ($p < 0,001$), МОС₂₅ на 30% ($p < 0,001$), СОС₂₅₋₇₅ на 39% ($p < 0,001$), по данным бодиплетизмографии выявлено статистически значимое увеличение показателей по медиане бронхиального сопротивления на вдохе на 58,8% ($p = 0,004$) и на выдохе на 58,8% ($p = 0,017$), что характерно для бронхиальной обструкции.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕГочНОЙ ФУНКЦИИ, ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕГКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

TABLE 1. PARAMETERS OF PULMONARY FUNCTION, CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH MILD ASTHMA

Параметры Parameters	Здоровые Healthy n = 25	Пациенты с БА Patients with asthma n = 53
Индекс Кетле, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	24,85 (22,91-25,58)	32,65 (28,94-35,40)
АСQ-тест, баллы ACQ test, scores	–	1,1 (0,6-1,4)
ЖЕЛ, % от должного VC, % of predicted	110,74 \pm 14,64	107 (96,1-117,4)
Е вд., % от должного IC, % of predicted	105,65 (98,28-121,70)	117 (102,90-135,75) $p = 0,008$
РО выд., % от должного ERV, % of predicted	124,65 (108,38-139,35)	60,8 (50,60-87,25) $p < 0,001$
ФЖЕЛ, % от должного FVC, % of predicted	105,5 (99,73-123)	105,3 (86,4-111)

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Параметры Parameters	Здоровые Healthy n = 25	Пациенты с БА Patients with asthma n = 53
ОФВ₁, % от должного FEV ₁ , % of predicted	104,4 (95,68-112)	92 (76,9-04,3) p = 0,015
ОФВ₁ / ЖЕЛ, % FEV ₁ / VC, %	74,81 (71,25-82,85)	67,8 (61,38-73,49) p < 0,001
ОФВ₁ / ФЖЕЛ, % FEV ₁ / FVC, %	78,72 (73,90-84,38)	78,72 (73,90-84,38) p = 0,002
МОС₇₅, % от должного MEF ₇₅ , % of predicted	100,45 (84,08-117,78)	74,3 (48,7-95,4) p = 0,003
МОС₅₀, % от должного MEF ₅₀ , % of predicted	82,85 (64,83-110,43)	50,4 (31,6-65,4) p < 0,001
МОС₂₅, % от должного MEF ₂₅ , % of predicted	46,45 (40,73-81,88)	32,45 (23,18-45,03) p < 0,001
СОС₂₅₋₇₅, % от должного MMEF ₂₅₋₇₅ , % of predicted	73,75 (57,55-97,05)	44,65 (25,93-56,63) p < 0,001
Сопр. вд., кПа × с/л R _{in} , kPa × s/l	0,17 (0,14-0,20)	0,27 (0,21-0,39) p = 0,004
Сопр. выд., кПа × с/л R _{ex} , kPa × s/l	0,22 (0,15-0,30)	0,37 (0,28-0,64) p = 0,017
Сопр. общ., кПа × с/л R _{tot} , kPa × s/l	0,19 (0,14-0,25)	0,31 (0,21-0,44) p = 0,006
ФОЕ, % от должного FRC _{plet} , % of predicted	113,5 (103,03-125,40)	101,6 (89,8-115,7)
ООЛ, % от должного RV, % of predicted	107,85 (92,68-118,53)	111,8 (91,3-140,1)
ОЕЛ, % от должного TLC, % of predicted	115 (95,48-120,33)	105 (95,9-112,8)
ООЛ / ОЕЛ, % RV / TLC, %	98,15 (91,13-100,50)	102,6 (92,5-125,0)
IL-2, пг/мл IL-2, pg/mL	16,15 (12,03-19,45)	16,6 (11,1-23,75)
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	4,78 (3,63-7,92)	6,93 (4,88-10,09) p = 0,004
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	4,66 (3,86-6,42)	4,67 (3,53-5,40)
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	5,33 (4,81-5,99)	4,87 (3,58-7,25)
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	2,24 (2,13-2,75)	2,33 (2,00-2,95)
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/mL	29,09 (25,11-36,79)	27,12 (21,87-41,14)
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/mL	38,24 (34,66-42,52)	59,59 (41,43-83,95) p = 0,018

Примечание. Дескриптивные статистики представлены как Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), где Me – медиана, Q_{0,25} – нижний квартиль, Q_{0,75} – верхний квартиль (при распределении, не соответствующем нормальному). p – статистическая значимость различий по сравнению с группой контроля; p₂ – статистическая значимость различий между группами без дисфункции МДП и с дисфункцией МДП; приведены значения только для p < 0,05.

Note. Descriptive statistics are represented as Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), where Me is the median, Q_{0,25} is the lower quartile, Q_{0,75} is the upper quartile (with a distribution that does not correspond to normal). p is the statistical significance of differences compared to the control group; p₂ is the statistical significance of differences between groups without TIR dysfunction and with TIR dysfunction; values are given only for p < 0.05.

ТАБЛИЦА 2. ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЛЕГОЧНОЙ ФУНКЦИИ, ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА (ПАРНЫЕ КОРРЕЛЯЦИИ ПО СПИРМЕНУ, r)

TABLE 2. RELATIONSHIPS BETWEEN INDICATORS OF PULMONARY FUNCTION, PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH ASTHMA AND OVERWEIGHT (PAIRED CORRELATIONS ACCORDING TO SPEARMAN, r)

Показатели Parameters	Значение коэффициента корреляции, r Value of the correlation coefficient, r	p-level
ЖЕЛ / IL-2 VC / IL-2	0,38	0,004
ФЖЕЛ / IL-2 FVC / IL-2	0,40	0,003
ОФВ ₁ / IL-2 FEV ₁ / IL-2	0,34	0,012
ОЕЛ / IL-2 TLC / IL-2	0,38	0,008
Е вд. / IL-4 IC / IL-4	0,37	0,047
ФЖЕЛ / IL-4 FVC / IL-4	-0,29	0,036
ОФВ ₁ / IL-4 FEV ₁ / IL-4	-0,30	0,028
ФОЕ / IL-6 FRC _{plet} / IL-6	0,28	0,047
ФОЕ / IL-17A FRC _{plet} / IL-17A	0,38	0,007
ООЛ / IL-17A RV / IL-17A	0,28	0,044
ОЕЛ / IL-17A TLC / IL-17A	0,31	0,031
МОС ₂₅ / TNF α MEF ₂₅ / TNF α	-0,28	0,045
Сопр. выд. / TNF α R _{ex} / TNF α	0,28	0,043
Сопр. вд. / IFN γ R _{in} / IFN γ	0,30	0,033
Сопр. выд. / IFN γ R _{ex} / IFN γ	0,42	0,002

Примечание. Приведены только статистически значимые корреляционные связи между показателями: при p < 0,05.

Note. Only statistically significant correlations between the indicators are given: at p < 0.05.

При оценке уровней цитокинов у пациентов с БА независимо от массы тела выявлено статистически значимое увеличение провоспалительных цитокинов IL-17A на 55,8% (p = 0,018) и противовоспалительного цитокина IL-4 на 44,9% (p = 0,004) по сравнению с контролем (табл. 1).

Результаты анализа взаимосвязей между показателями ФВД и про- и противовоспалительными цитокинами в данной группе представлены в таблице 2, приведены только статистически значимые взаимосвязи.

Наибольшее количество связей выявлено для IL-2: прямые корреляции с показателями ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ₁, ОЕЛ. Цитокин IL-17A имел прямые зависимости со всеми показателями, характеризующими дисфункцию МДП (ФОЕ, ООЛ, ОЕЛ). Отмечена также прямая корреляция между IL-6 и уровнем ФОЕ, IFN γ и показателями сопротивления вдоха и выдоха. Провоспалительный цитокин TNF α имел отрицательную корреляцию с МОС₂₅ и прямую корреляцию с показателем сопротивления выдоха. Определе-

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕГОЧНОЙ ФУНКЦИИ, ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С ДИСФУНКЦИЕЙ И БЕЗ ДИСФУНКЦИИ МАЛЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

TABLE 3. INDICATORS OF PULMONARY FUNCTION, CYTOKINE PROFILE IN ASTHMA PATIENTS WITH AND WITHOUT DYSFUNCTION OF THE SMALL AIRWAYS

Параметры Parameters	Группа 1 Group 1 n = 9	Группа 2 Group 2 n = 44
Возраст, лет Age, years	57,67±11,69	53,95±14,25
Индекс Кетле, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	34,55 (30,1-36,79)	32,7 (30,93-34,65)
АСQ-тест, баллы ACQ test, scores	1,4 (1,0-1,6) p = 0,017	1,05 (0,6-1,2)
ЖЕЛ, % от должного VC, % of predicted	106,9 (90,5-110,8)	107,2 (97,15-118,38)
Е вд., % от должного IC, % of predicted	122,5 (106,43-134,00)	115,7 (102,90-137,95)
РО выд., % от должного ERV, % of predicted	53,35 (44,20-55,93)	72,4 (51,85-93,20)
ФЖЕЛ, % от должного FVC, % of predicted	86,3 (83,3-107,8)	105,55 (93,78-111,95)
ОФВ ₁ , % от должного FEV ₁ , % of predicted	86,3 (83,3-107,8) p = 0,021	94,55 (80,03-105,10)
ОФВ ₁ / ЖЕЛ, % FEV ₁ / VC, %	57,97 (46,94-64,90) p = 0,004	69,96 (64,03-74,08)
ОФВ ₁ / ФЖЕЛ, % FEV ₁ / FVC, %	62,53 (55,36-73,41) p = 0,003	74,25 (71,02-79,58)
МОС ₇₅ , % от должного MEF ₇₅ , % of predicted	40,3 (23,2-63,4) p = 0,032	77,7 (53,85-96,30)
МОС ₅₀ , % от должного MEF ₅₀ , % of predicted	25,9 (18,8-47,3) p = 0,032	55,6 (37,53-66,68)
МОС ₂₅ , % от должного MEF ₂₅ , % of predicted	25,3 (17,35-30,50)	33,2 (23,2-45,9)
СОС ₂₅₋₇₅ , % от должного MMEF ₂₅₋₇₅ , % of predicted	28,75 (13,93-35,30) p = 0,045	49,75 (30,58-58,13)
Сопр. вд., кПа × с/л R _{in} , kPa × s/l	0,29 (0,22-0,33)	0,27 (0,21-0,40)
Сопр. выд., кПа × с/л R _{ex} , kPa × s/l	0,44 (0,39-0,67)	0,36 (0,23-0,54)
Сопр. общ., кПа × с/л R _{tot} , kPa × s/l	0,33 (0,27-0,44)	0,3 (0,21-0,45)
ФОЕ, % от должного FRC _{plet} , % of predicted	117,5 (97,0-133,8) p = 0,002	99,9 (87,45-109,88)
ООЛ, % от должного RV, % of predicted	136,3 (112,5-169,0) p = 0,006	107,3 (87,15-138,90)
ОЕЛ, % от должного TLC, % of predicted	110 (102,3-116,5) p = 0,042	104,6 (93,70-111,83)
ООЛ / ОЕЛ, % RV / TLC, %	132,2 (100,1-144,1) p = 0,014	99,75 (91,25-118,93)

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Параметры Parameters	Группа 1 Group 1 n = 9	Группа 2 Group 2 n = 44
IL-2, пг/мл IL-2, pg/mL	20,6 (17,1-27,5) p = 0,039	15,23 (10,52-22,63)
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	11,99 (9,41-19,17) p = 0,017	6,03 (4,63-8,39)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	5,55 (5,33-6,46) p = 0,012	4,1 (3,46-5,12)
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	7,25 (4,46-9,66) p = 0,001	4,68 (3,39-6,55)
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	3,19 (2,92-3,51) p = 0,013	2,22 (1,97-2,82)
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	79,2 (47,30-106,47) p < 0,001	25,19 (21,35-33,20)
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/mL	92,12 (87,60-104,14) p < 0,001	57,86 (39,78-74,85)

Примечание. Дескриптивные статистики представлены как Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), где Me – медиана, $Q_{0,25}$ – нижний квартиль, $Q_{0,75}$ – верхний квартиль (при распределении, не соответствующем нормальному). p – достоверность различий между группами. Приведены значения только для p < 0,05.

Note. Descriptive statistics are represented as Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), where Me is the median, $Q_{0,25}$ is the lower quartile, $Q_{0,75}$ is the upper quartile (with a distribution that does not correspond to normal). p, the reliability of the differences between the groups. Values are given only for p < 0.05.

ны отрицательные ассоциативные связи между уровнем противовоспалительного цитокина IL-4 и такими показателями как ФЖЕЛ и ОФВ₁.

С учетом основных показателей, характеризующих дисфункцию МДП и цитокинов, был применен кластерный анализ, который позволил классифицировать пациентов с БА на 2 группы в зависимости от состояния МДП и уровня про- и противовоспалительных цитокинов (табл. 3).

В 1-ю группу вошли 9 пациентов с дисфункцией МДП (средний возраст 57,67±11,69 лет), во 2-ю группу – 44 пациента без дисфункции МДП (средний возраст 53,95±14,25 лет). Отмечено, что в 1-ю группу попали пациенты с ожирением 1-2-й степени, в то время как во 2-й группе преимущественно были пациенты с ожирением 1-й степени. Проведенный статистический анализ показателей ФВД и уровней цитокинов выявил достоверные их различия в группах.

У пациентов 1-й группы, имеющих признаки дисфункции МДП, по сравнению со 2-й группой, выявлены статистически значимые различия по таким показателям, как ФОЕ (p = 0,002), ООЛ (p = 0,006), ООЛ/ОЕЛ (p = 0,014), по АСQ-тесту (p = 0,017). Установлены различия уровней практически всех исследуемых цитокинов в группах пациентов. Отмечено повышение содержания IL-2 в 1,3 раза (p = 0,039), IL-4 практически в 2 раза (p = 0,017), IL-10 в 1,5 раза (p = 0,001), IL-6 в 1,3 раза (p = 0,001), TNF α в 1,4 раза (p = 0,013),

IFN γ в 3 раза (p < 0,001) и IL-17A в 1,5 раза (p < 0,001).

У пациентов с БА, имеющих дисфункцию МДП (1-я группа), отмечено наибольшее количество ассоциативных связей для IL-10 с показателями спирометрии (ЖЕЛ, Емкость вдоха, ФЖЕЛ, ОФВ₁, ОФВ₁/ЖЕЛ). Установлены также положительные корреляции для IL-17A с показателями, характеризующими дисфункцию МДП (ФОЕ, ООЛ, ОЕЛ, ООЛ/ОЕЛ), IL-6 (ФОЕ, ООЛ, ОЕЛ) и IFN γ с показателями, указывающими на наличие обструкции по данным бодиплетизмографии (сопротивление вдоха, выдоха и общее сопротивление). В этой группе выявлена обратная корреляция для противовоспалительного цитокина IL-4 с ЖЕЛ, емкостью вдоха и прямая корреляция с сопротивлением выдоха.

У пациентов 2-й группы без дисфункции МДП по количеству статистически значимых корреляций ведущими показателями явились IL-2 (прямые корреляции с такими показателями, как ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ₁, МОС₂₅, МОС₅₀, СОС₂₅₋₇₅, ОЕЛ), IL-17A (прямые корреляции с показателями резервного объема выдоха, обратные с ООЛ, ООЛ/ОЕЛ, общего бронхиального сопротивления на вдохе и выдохе). В отличие от 1-й группы выявлены отрицательные корреляции противовоспалительного цитокина IL-4 с ООЛ и ООЛ/ОЕЛ, IL-10 с ООЛ/ОЕЛ, IL-6 с ООЛ и ООЛ/ОЕЛ, положительные ассоциации IFN γ с

ТАБЛИЦА 4. ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЛЕГОЧНОЙ ФУНКЦИИ, ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С ДИСФУНКЦИЕЙ И БЕЗ ДИСФУНКЦИИ МАЛЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ (ПАРНЫЕ КОРРЕЛЯЦИИ ПО СПИРМЕНУ, r)

TABLE 4. RELATIONSHIPS BETWEEN INDICATORS OF PULMONARY FUNCTION, PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN ASTHMA PATIENTS WITH AND WITHOUT DYSFUNCTION OF THE SMALL AIRWAYS (PAIRED CORRELATIONS ACCORDING TO SPEARMAN, r)

Показатели Parameters	Значение коэффициента корреляции, r Value of the correlation coefficient, r	p-level
Группа 1 Group 1		
ЖЕЛ / IL-2 VC / IL-2	-0,68	0,042
Е вд. / IL-4 IC / IL-4	-0,74	0,037
Сопр. выд. / IL-4 R _{in} / IL-4	0,70	0,036
ФОЕ / IL-6 FRC _{plet} / IL-6	0,66	0,041
ООЛ / IL-6 RV / IL-6	0,71	0,022
ОЕЛ / IL-6 TLC / IL-6	0,74	0,016
ЖЕЛ / IL-10 VC / IL-10	0,75	0,014
Е вд. / IL-10 IC / IL-10	0,75	0,015
ФЖЕЛ / IL-10 FVC / IL-10	0,86	0,016
ОФВ₁ / IL-10 FEV ₁ / IL-10	0,72	0,019
ОФВ₁ / ЖЕЛ / IL-10 FEV ₁ / VC / IL-10	0,67	0,049
Сопр. вд. / IFNγ R _{in} / IFN γ	0,78	0,009
Сопр. выд. / IFNγ R _{ex} / IFN γ	0,70	0,025
Сопр. общ. / IFNγ R _{tot} / IFN γ	0,73	0,018
ФОЕ / IL-17A FRC _{plet} / IL-17A	0,62	0,05
ООЛ / IL-17A RV / IL-17A	0,69	0,029
ОЕЛ / IL-17A TLC / IL-17A	0,76	0,012
ООЛ/ОЕЛ / IL-17A RV/TLC / IL-17A	0,52	0,011

Таблица 4 (окончание)
Table 4 (continued)

Показатели Parameters	Значение коэффициента корреляции, r Value of the correlation coefficient, r	p-level
Группа 2 Group 2		
ЖЕЛ / IL-2 VC / IL-2	0,45	0,002
ФЖЕЛ / IL-2 FVC / IL-2	0,46	0,002
ОФВ₁ / IL-2 FEV ₁ / IL-2	0,46	0,002
МОС₂₅ / IL-2 MEF ₂₅ / IL-2	0,38	0,016
МОС₅₀ / IL-2 MEF ₅₀ / IL-2	0,37	0,017
СОС₂₅₋₇₅ / IL-2 MMEF ₂₅₋₇₅ / IL-2	0,43	0,005
ОЕЛ / IL-2 TLC / IL-2	0,32	0,038
ООЛ / IL-4 RV / IL-4	-0,35	0,019
ООЛ / ОЕЛ / IL-4 RV/TLC / IL-4	-0,34	0,023
ООЛ / IL-6 RV / IL-6	-0,35	0,018
ООЛ / ОЕЛ / IL-6 RV/TLC / IL-6	-0,32	0,033
ООЛ / ОЕЛ / IL-10 RV / TLC / IL-10	-0,30	0,049
РО выд. / TNFα ERV / TNF α	0,39	0,011
Сопр. выд. / TNFα R _{ex} / TNF α	0,31	0,043
РО выд. / IL-17A ERV / IL-17A	0,34	0,027
Сопр. общ. / IL-17A R _{tot} / IL-17A	-0,31	0,046
ООЛ / IL-17A RV / IL-17A	-0,36	0,021
ООЛ/ОЕЛ / IL-17A RV / TLC / IL-17A	-0,36	0,021
РО выд. / IFNγ ERV / IFN γ	0,32	0,036
ООЛ / IFNγ RV / IFN γ	-0,31	0,044
ООЛ / ОЕЛ / IFNγ RV / TLC / IFN γ	0,37	0,015

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ООЛ/ОЕЛ и отрицательные с ООЛ, указывающими на наличие воздушных ловушек, а также TNF α с резервным объемом выдоха и сопротивлением выдоха.

Обсуждение

Выявленные изменения показателей спирометрии у пациентов с БА легкой степени тяжести (увеличение емкости вдоха, снижение уровня резервного объема выдоха, снижение показателя ОФВ₁ и его соотношения с уровнем ЖЕЛ и ФЖЕЛ), а также данные бодиплетизмографии (повышение уровней сопротивления вдоха и выдоха, общего сопротивления) свидетельствует о наличии у обследуемых бронхиальной обструкции, характерной для БА. Показатели бодиплетизмографии (ООЛ, ООЛ/ОЕЛ, ФОЕ), используемые как критерии дисфункции МДП, у больных БА статистически значимо не отличались от значений в группе здоровых. При этом данные спирометрии косвенно свидетельствовали о нарушении функции периферических дыхательных путей у больных БА с ожирением. Так, снижение соотношения ОФВ₁/ФЖЕЛ и СОС₂₅₋₇₅ отражает наличие обструкции бронхов и, по мнению некоторых авторов, может выступать индикатором дисфункции МДП [1].

При изучении цитокиновой активности в сыворотке крови выявлено увеличение содержания цитокинов IL-4 и IL-17A, что позволяет предположить наличие разных типов иммунного ответа у больных с легкой БА и ожирением [3]. Избыточное производство IL-4 связано с аллергией и характерно в большей степени для атопической БА [14]. Повышение уровня IL-17A у пациентов указывает на участие Th17-опосредованных иммунных механизмов в развитии и прогрессировании заболевания. Продукция IL-17A приводит к активации нейтрофилов и других антимикробных факторов и формированию аутоиммунного типа воспаления. Такая закономерность свидетельствует о наличии нейтрофильного типа воспаления у пациентов с БА, ассоциированной с ожирением [19].

Использование корреляционного анализа позволило выявить цитокины, влияющие на состояние функции внешнего дыхания. Прежде всего интерес представляли цитокины, уровень которых был повышен. Установленные отрицательные связи IL-4 с показателями спирометрии ФЖЕЛ и ОФВ₁, указывают на роль этого цитокина в развитии бронхиальной обструкции при БА. Данные эффекты связаны с тем, что IL-4 с одной стороны подавляет функции макрофагов и секрецию ими IL-1, TNF α , IL-6, обеспечивая, таким образом, противовоспалительный эффект, с другой – повышает цитотоксическую активность макрофагов, способствуя миграции в очаг воспа-

ления нейтрофилов, что приводит к хронизации и прогрессированию процесса, в том числе развитию бронхиальной обструкции [8]. Ассоциативные связи IL-17A с показателями ФОЕ, ООЛ, ОЕЛ указывают на влияние данного цитокина на развитие и прогрессирование воспаления МДП, формирование воздушных ловушек и гиперинфляции.

Несмотря на то, что уровень IL-2 у больных легкой БА статистически достоверно не отличался от его значений в контрольной группе, для этого цитокина выявлено наибольшее количество прямых умеренных связей с функциональными показателями (ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ₁, ОЕЛ), что подтверждает его роль в развитии воспалительного процесса в бронхах на ранних стадиях заболевания [8].

Выявленные прямые корреляционные связи для IL-6 с уровнем ФОЕ, TNF α и IFN γ с показателем бронхиального сопротивления выдоха и отрицательная корреляция TNF α с уровнем МОС₂₅ позволяют рассматривать данные цитокины как маркеры развития обструкции дистальных отделов при БА легкого течения.

Таким образом, выявленный цитокиновый дисбаланс свидетельствует о смешанных механизмах иммунного реагирования при легкой БА в сочетании с ожирением, влияющим на развитие воспаления и обструкцию дыхательных путей.

По результатам кластерного анализа выделено две группы с определенным иммуно-функциональным вариантом легкой БА в сочетании с ожирением. Варианты характеризовались достоверными различиями по показателям, отражающим состояние функции МДП (ФЖЕЛ, ОФВ₁, СОС₂₅₋₇₅, ФОЕ, ООЛ, ООЛ/ОЕЛ). Такие показатели как ФЖЕЛ, ОФВ₁, ОФВ₁/ФЖЕЛ, СОС₂₅₋₇₅, которые отражают наличие или отсутствие обструкции бронхов на разных уровнях, могут выступать в качестве индикатора ремоделирования дыхательных путей [13]. Изменения ООЛ, ОЕЛ, ООЛ/ОЕЛ, ФОЕ, выявленные в 1-й группе пациентов, свидетельствуют о дисфункции МДП [4, 18].

Наблюдаемый в обеих группах цитокиновый дисбаланс согласуется с данными о том, что при БА независимо от фенотипа происходит гиперпродукция цитокинов, от которых зависит интенсивность воспалительного ответа [16]. Установлено, что у больных БА с дисфункцией МДП (1-я группа) цитокиновый дисбаланс был более выраженным по сравнению со 2-й группой. Так, уровень IL-2 был повышен в 1,3 раза, IL-4 в 2 раза, IL-10 в 1,5 раза, IL-6 в 1,3 раза, TNF α в 1,4 раза, IFN γ в 3 раза, IL-17A в 1,5 раза. При наличии дисфункции МДП на фоне гиперцитокинемии у пациентов с легкой БА в сочетании с ожирением (1-я группа) уровень контроля по данным АСQ-теста был ниже. Известно, что ин-

тенсивность противовоспалительного иммунного ответа зависит от уровня провоспалительного каскада. Цитокины, выделяемые при макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации, взаимно активируют эти клетки, создавая порочный круг, который поддерживает возникшую воспалительную реакцию, следовательно, влияют на степень контроля БА.

Стойкое воспаление дыхательных путей не только вызывает симптомы астмы, но и приводит к процессу ремоделирования бронхов. Выявленные в 1-й группе положительные корреляции IL-10 с показателями спирометрии (ЖЕЛ, Емкость вдоха, ФЖЕЛ, ОФВ₁, ОФВ₁/ЖЕЛ) свидетельствуют о его неоднозначной роли в воспалении при БА. С одной стороны, IL-10 подавляет продукцию Т-лимфоцитами IL-2 и IFN γ и способствует активации Th2-типа иммунного ответа. С другой стороны, у этого медиатора есть иммуносупрессивные эффекты, проявляющиеся через индукцию Treg1-клеток в Th17-клетки. При выраженных воспалительных реакциях IL-10 может секретироваться не только макрофагами, но и антиген-неспецифичными CD8⁺ клетками, что не всегда указывает на прогностически благоприятный вариант развития заболевания [16].

Установленные в 1-й группе положительные корреляции IL-17A, IL-6 с показателями, отражающими состояние МДП (ФОЕ, ООЛ, ОЕЛ, ООЛ/ОЕЛ) и IFN γ с показателями, указывающими на наличие обструкции по данным бодиплетизмографии (сопротивление вдоха, выдоха и общее сопротивление), позволяют рассматривать данные цитокины как биомаркеры дисфункции и ремоделирования малых дыхательных путей при легкой БА, ассоциированной с ожирением. Основную роль в формировании нейтрофильного воспаления играют Th17-лимфоциты с продукцией IL-17, IL-8, IL-32. Дифференцирование Th1-лимфоцитов в Th17-лимфоциты происходит под воздействием IL-1, IL-6, IL-23. В проведенном исследовании у пациентов 1-й группы с дисфункцией МДП уровень IL-6 превышал аналогичный показатель пациентов 2-й группы на 34%, что способствовало увеличению IL-17A. Продукция IL-17 приводит к активации нейтрофилов и других антимикробных факторов. Более тяжелое течение фенотипа БА с ожирением, по мнению некоторых исследователей, может быть объяснимо связью между IL-17 и индексом массы тела [7].

Обращает на себя внимание выявленные во 2-й группе обратные корреляции противовоспалительного цитокина IL-4 с ООЛ и ООЛ/ОЕЛ и IL-10 с ООЛ/ОЕЛ, IL-6 с ООЛ и ООЛ/ОЕЛ, IL-17A с ООЛ, ООЛ/ОЕЛ, общим бронхиальным сопротивлением на вдохе и выдохе, IFN γ с ООЛ и положительные ассоциации с ООЛ/ОЕЛ. Известно, что цитокины, отвечающие за активацию

Th2-клеток (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), IL-6, TNF α , IFN γ и другие участвуют в поддержании аллергического воспаления, особенно на фоне уже сформировавшегося процесса. Они играют ключевую роль в его регуляции при БА, усугубляя бронхообструктивные нарушения и отражая тяжесть течения БА [6]. Важнейшую роль в этом играют IFN γ и IL-4. При этом IFN γ , обладает наиболее выраженными иммуномодулирующими свойствами, регулирует клеточно-опосредованный иммунный ответ, а IL-4 и IL-10 – гуморальный [2, 13]. Отрицательные корреляции IL-17A, IL-6, IFN γ с показателями, характеризующими состояние МДП, могут свидетельствовать о том, что дисфункция МДП развивается у пациентов с преимущественным неаллергическим типом воспаления. Семейство цитокинов IL-17, IFN γ и IL-6 играют важную роль в формировании иммунного ответа и нейтрофильного воспаления при БА и тесно связано с более тяжелым течением заболевания [3].

Заключение

Проведенное исследование выявило особенности функции внешнего дыхания в зависимости от цитокинового статуса при БА легкой степени тяжести, протекающей на фоне ожирения. Выделено два иммуно-функциональных варианта (эндотипа), отличающихся активностью системного воспаления, типом иммунного ответа и состоянием МДП. Полученные данные свидетельствуют, что дисфункция МДП более характерна для неаллергической БА с преобладанием Th1-иммунного ответа и нейтрофильной БА с преобладанием Th17-иммунного ответа. Выявлена ассоциация IL-17A, IL-6 с показателями, отражающими состояние МДП (ФОЕ, ООЛ, ОЕЛ, ООЛ/ОЕЛ), IFN γ с показателями указывающими на наличие обструкции (бронхиальное сопротивление на вдохе, выдохе и общее сопротивление). Это позволяет рассматривать данные цитокины как биомаркеры дисфункции и ремоделирования малых дыхательных путей при БА легкой степени тяжести.

Вопрос, относится ли БА с ожирением, сопровождающаяся дисфункцией периферических дыхательных путей, к определенным клиническим или воспалительным фенотипам или является конкретным эндотипом остается открытым.

Ограничения

Проведенное исследование имеет ряд ограничений. В исследовании принимали участие пациенты с БА частично контролируемого течения, легкой степени тяжести, имеющие ожирение 1-2-й степени. Полученные результаты могут отличаться от таковых при БА более тяжелого течения с различной степенью контроля и ожирении 3-4-й степени.

Список литературы / References

1. Айсанов З.Р., Калманова Е.Н. Поражение малых дыхательных путей при бронхиальной астме: новые данные, новая парадигма // Практическая пульмонология, 2019. № 1. С. 6-14. [Aisanov Z.R., Kalmanova E.N. The lesion of small airways in patients with asthma: new data, new paradigm. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical Pulmonology*, 2019, no. 1, pp. 6-14. (In Russ.)]
2. Караулов А.В., Анисимова Н.Ю., Должикова Ю.И., Сокурено С.И., Ликов В.Ф., Борисова Т.В., Киселевский М.В. Спонтанная и индуцированная продукция цитокинов лейкоцитами периферической крови у больных бронхиальной астмой в стадии обострения // Российский биотерапевтический журнал, 2010. Т. 9, № 4. С. 93-96. [Karaulov A.V., Anisimova N.Yu., Dolzhikova Yu.I., Sokurenko S.I., Likov V.F., Borisova T.V. et al. Spontaneous and induced cytokines production by peripheral blood leukocytes in patients with asthma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2010, Vol. 9, no. 4, pp. 93-96. (In Russ.)]
3. Курбачева О.М., Жестков А.В., Нагаткин Д.А., Кулагина В.В., Нагаткина О.В. Современный взгляд на иммунопатогенез бронхиальной астмы // Российский аллергологический журнал, 2016. № 2. С. 10-14. [Kurbacheva O.M., Zhestkov A.V., Nagatkin D.A., Kulagina V.V., Nagatkina O.V. Modern view on immunopathogenesis of asthma. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2016, no. 2, pp. 10-14. (In Russ.)]
4. Минеева Е.Е., Антонюк М.В., Юренко А.В., Гвозденко Т.А. Функциональное состояние малых дыхательных путей у пациентов с бронхиальной астмой, ассоциированной с ожирением // Терапевтический архив, 2019. Т. 91, № 1. С. 60-63. [Mineeva E.E., Antonyuk M.V., Yurenko A.V., Gvozdenko T.A. Functional state of the small airways in patients with bronchial asthma associated with obesity. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2019, Vol. 91, no. 1, pp. 60-63. (In Russ.)]
5. Минеева Е.Е., Антонюк М.В., Юренко А.В., Гвозденко Т.А., Уксуменко А.А. Дисфункция малых дыхательных путей и состояние легочной функции при легкой бронхиальной астме // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2020. № 78. С. 76-83. [Mineeva E.E., Antonyuk M.V., Yurenko A.V., Gvozdenko T.A., Uksumenko A.A. Small airways dysfunction and the state of lung function in mild asthma. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Respiratory Physiology and Pathology*, 2020, no. 78, pp. 76-83. (In Russ.)]
6. Мурашов Э.Г., Столов С.В., Тотолян А.А. Участие иммуновоспалительных механизмов в патогенезе различных вариантов бронхиальной астмы // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, 2015. Т. 7, № 1. С. 115-121. [Murasov E.G., Stolov S.V., Totolian A.A. The involvement of immuno-inflammatory mechanisms in the pathogenesis of various variants of bronchial asthma. *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im. I.I. Mechnikova = Bulletin of the I. Mechnikov Northwestern State Medical University*, 2015, Vol. 7, no. 1, pp. 115-121. (In Russ.)]
7. Нурдина М.С., Купаев В.И. Взаимосвязь уровня IL-17, IL-10 со степенью контроля бронхиальной астмы // Вестник современной клинической медицины, 2017. Т. 10, № 3. С. 35-38. [Nurdina M.S., Kupaev V.I. Orrelation between serum IL-17 and IL-10 level and asthma control. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Journal of Modern Clinical Medicine*, 2017, Vol. 10, no. 3, pp. 35-38. (In Russ.)]
8. Собко Е.А., Соловьева И.А., Ищенко О.П., Крапошина А.Ю., Демко И.В., Чубарова С.В. Изменение цитокинового профиля крови у больных бронхиальной астмой тяжелого течения с ожирением // Российский аллергологический журнал, 2013. Т. 10, № 6. С. 13-19. [Sobko E.A., Soloveva I.A., Ischenko O.P., Kraposhina A.Y., Demko I.V., Chubarova S.V. Cytokines profile in blood in severe asthma patients with obesity. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2013, Vol. 10, no. 6, pp. 13-19. (In Russ.)]
9. Трушина Е.Ю., Костина Е.М., Баранова Н.И., Типикин В.А. Роль цитокинов как молекулярных маркеров воспаления при неаллергической бронхиальной астме // Современные проблемы науки и образования, 2018. № 4. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27799>. (Дата обращения: 06.04.2021). [Trushina E.Y., Kostina E.M., Baranova N.I., Tipikin V.A. The cytokines role as inflammation molecular markers in non-allergic asthma. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 4. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27799>. (Date of the application: April 6, 2021). (In Russ.)]
10. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Негруца К.В., Тимчик В.Г., Голубева В.И., Александрин В.А., Разумовская Т.С., Крякунов К.Н. К вопросу о роли цитокинов в патогенезе бронхиальной астмы и возможностях антицитокиновой терапии // Российский аллергологический журнал, 2016. № 6. С. 23-36. [Fedoseev G.B., Trofimov V.I., Negrutza K.V., Timchik V.G., Golubeva V.I., Aleksandrin V.A., Razumovskaya T.S., Kryakunov K.N. Regarding to the issue of the role of cytokines in the pathogenesis of asthma and the possibilities of anticytokine therapy. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2016, no. 6, pp. 23-36. (In Russ.)]
11. Battaglia S., den Hertog H., Timmers M.C., Lazeroms S.P., Vignola A.M., Rabe K.F., Bellia V., Hiemstra P.S., Sterk P.J. Small airways function and molecular markers in exhaled air in mild asthma. *Thorax*, 2005, Vol. 60, no. 8, pp. 639-644.
12. BMI classification. Available at: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html. https://medstatistic.ru/theory/odds_ratio.html.
13. Cheng S.L. Immunologic pathophysiology and airway remodeling mechanism in severe asthma: Focused on IgE-mediated pathways. *Diagnostics (Basel)*, 2021, Vol. 11, no. 1, 83. doi: 10.3390/diagnostics11010083.

14. Cui A.H., Zhao J., Liu S.X., Hao Y.S. Associations of IL-4, IL-6, and IL-12 levels in peripheral blood with lung function, cellular immune function, and quality of life in children with moderate-to-severe asthma. *Medicine*, 2017, Vol. 96, no. 12, e6265. doi: 10.1097/MD.00000000000006265.
15. Juniper E.F., Bousquet J., Abetz L., Bateman E.D.; GOAL Committee. Identifying 'well-controlled' and 'not well-controlled' asthma using the Asthma Control Questionnaire. *Respir. Med.*, 2006, Vol. 100, no. 4, pp. 616-621.
16. Ogawa Y., Duru E.A., Ameredes B.T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr. Mol. Med.*, 2008, Vol. 8, no. 5, pp. 437-445.
17. Pellegrino R., Viegi G., Brusasco V., Crapo R.O., Burgos F., Casaburi R., Coates A., van der Grinten C.P.M., Gustafsson P., Hankinson J., Jensen R., Johnson D.C., MacIntyre N., McKay R., Miller M.R., Navajas D., Pedersen O.F., Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur. Respir. J.*, 2005, no. 26, pp. 948-968.
18. Sorkness R.L., Bleecker E.R., Busse W.W., Calhoun W.J., Castro M., Chung K.F., Curran-Everett D., Erzurum S.C., Gaston B.M., Israel E., Jarjour N.N., Moore W.C., Peters S.P., Teague W.G., Wenzel S.E., National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. Lung function in adults with stable but severe asthma: air trapping and incomplete reversal of obstruction with bronchodilation. *J. Appl. Physiol.*, 2008, Vol. 104, no. 2, pp. 394-403.
19. Yurenko A.V., Antonyuk M.V., Mineeva E.E., Novgorodtseva T.P., Khodosova K.K. Features of cytokine and adipokine regulation in asthma associated with obesity. *Russian Open Med. J.*, 2019, Vol. 8, Iss. 2, e0203. doi: 10.15275/rusomj.2019.0203.
20. Zimmermann N., Hershey G.K., Foster P.S., Rothenberg M.E. Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, no. 111, pp. 227-242.
21. Zissler U.M., Esser-von Bieren J., Jakwerth C.A., Chaker A.M., Schmidt-Weber C.B. Current and future biomarkers in allergic asthma. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. 4, pp. 475-494.

Авторы:

Юренко А.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, врач-терапевт, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания, г. Владивосток, Россия

Антонюк М.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией восстановительного лечения, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания, г. Владивосток, Россия

Минеева Е.Е. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, врач функциональной диагностики, врач-пульмонолог, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания, г. Владивосток, Россия

Ходосова К.К. — младший научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания, г. Владивосток, Россия

Authors:

Yurenko A.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Rehabilitative Treatment, Therapist, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Antonyuk M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Rehabilitative Treatment, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Mineeva E.E., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Rehabilitative Treatment, Doctor of Functional Diagnostics, Clinical Pulmonologist, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Khodosova K.K., Junior Research Associate, Laboratory of Biomedical Research, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

ПЕРВЫЕ И ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ ГРИППА В 2020-2022 гг. И ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ НАКАНУНЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЕЗОНА

Колосова Н.П., Ильичева Т.Н., Святченко С.В., Даниленко А.В.,
Онхонова Г.С., Иванова К.И., Сулопаров И.М., Рыжиков А.Б.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Цель работы – анализ популяционного иммунитета к гриппу и молекулярно-генетическое исследование вирусов гриппа, выявленных в Российской Федерации в 2020-2022 гг. Исследовано 1344 образца сыворотки крови, собранных накануне эпидсезона 2021-2022 гг. в Сибирском, Южном, Дальневосточном, Приволжском, Уральском федеральных округах. К вакцинному штамму A/Victoria/2570/2019 (H1N1) pdm09 положительных образцов было от 25% до 31% в четырех ФО и 8% в Дальневосточном ФО. К штамму A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2) было от 24% до 37% положительных образцов. Наиболее низкий популяционный иммунитет был к вакцинному штамму вируса гриппа B/Washington/02/2019 (линия Виктория), не выше 10% положительных образцов во всех регионах сбора.

С началом пандемии COVID-19 (март 2020 г.) в мире резко снизилась циркуляция всех сезонных респираторных вирусов, за исключением риновирусов. В 2020-2022 гг. активность гриппа была значительно ниже межсезонных норм, с очень низким уровнем выявления вирусов гриппа А и/или В. С марта 2020 г. по июнь 2021 г. нами было выявлено 6 вирусов гриппа В/Victoria от спорадических случаев заболевания гриппом. С июня 2021 г. по конец февраля 2022 в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора поступил 901 образец, положительный на наличие РНК вируса гриппа А(H3N2), 2 образца положительных на РНК вируса А(H1N1) pdm09, 17 образцов положительных на грипп В. Все исследованные вирусы А(H3N2) принадлежали к субкладе 3С.2a1b.2a2 (группа Бангладеш). Два выявленных вируса гриппа А(H1N1) pdm09 относились к кладе 6В.1А.5а. Вирусы гриппа В относились к генетической линии В/Victoria и принадлежали к субкладе 1А.3а2. Геномы всех выявленных вирусов не содержали мутации в гене NA, ответственные за лекарственную устойчивость к ингибиторам нейраминидазы, или мутации в гене PA, ответственные за лекарственную устойчивость к балоксавиру. Все тестированные флуоресцентным методом штаммы были чувствительны к антинейраминидазным препаратам озелтамивиру и занамивиру. В мире устойчивые к антинейраминидазным препаратам изоляты вируса гриппа выявляются не чаще, чем в 1-2% случаев, поэтому озелтамивир и занамивир остаются эффективным средством для лечения сезонного гриппа.

Ключевые слова: сезонные вирусы гриппа, популяционный иммунитет, реакция торможения гемагглютинации, молекулярно-генетический анализ, чувствительность к антинейраминидазным ингибиторам

Адрес для переписки:

Ильичева Татьяна Николаевна
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Россия, Новосибирская обл., Кольцово.
Тел.: 8 (383) 363-47-00 (доб. 26-88).
Факс: 8 (383) 336-74-09.
E-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Tatyana N. Ilyicheva
State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo.
Phone: +7 (383) 363-47-00 (acc. 26-88).
Fax: +7 (383) 336-74-09.
E-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

Н.П. Колосова, Т.Н. Ильичева, С.В. Святченко,
А.В. Даниленко, Г.С. Онхонова, К.И. Иванова,
И.М. Сулопаров, А.Б. Рыжиков «Первые и тяжелые
случаи гриппа в 2020-2022 гг. и популяционный
иммунитет накануне эпидемического сезона»
// Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.
С. 1219-1226. doi: 10.15789/1563-0625-IAS-2513

© Колосова Н.П. и соавт., 2022

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.P. Kolosova, T.N. Ilyicheva, S.V. Svyatchenko,
A.V. Danilenko, G.S. Onkhonova, K.I. Ivanova,
I.M. Susloparov, A.B. Ryzhikov «Initial and severe cases
of influenza in 2020-2022 and population immunity prior
to epidemic season», Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6,
pp. 1219-1226. doi: 10.15789/1563-0625-IAS-2513

© Kolosova N.P. et al., 2022

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IAS-2513

INITIAL AND SEVERE CASES OF INFLUENZA IN 2020-2022 AND POPULATION IMMUNITY PRIOR TO EPIDEMIC SEASON

Kolosova N.P., Ilyicheva T.N., Svyatchenko S.V., Danilenko A.V., Onkhonova G.S., Ivanova K.I., Susloparov I.M., Ryzhikov A.B.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The purpose of the present work was to evaluate population immunity to influenza and molecular genetic analysis of influenza viruses detected in the Russian Federation over 2020-2022. In this study, 1344 samples of blood serum collected prior to the 2021-2022 flu season in Siberian, Southern, Far Eastern, Volga and Ural Federal Districts were studied. Seropositivity to the A/Victoria/2570/2019 vaccine strain (H1N1) pdm09 was detected in 25% to 31% of samples from the four federal districts, and in 8% of samples from the Far Eastern Federal District. Seropositivity to the A/Cambodia/e0826360/2020 strain (H3N2) was detected in 24% to 37% of the samples. The lowest population immunity was revealed to the influenza B/Washington/02/2019 vaccine strain (Victoria lineage), with < 10% of serum samples reactive to the studied strain. Since March 2020, the worldwide turnover of all seasonal respiratory viruses has sharply decreased, except of rhinoviruses. From March 2020 to June 2021, we have identified six B/Victoria influenza viruses from sporadic cases of influenza. From June 2021 to the end February 2022, the State Research Center "Vector" received 901 samples positive for influenza A(H3N2) virus RNA, two specimens positive for A(H1N1) pdm09 virus RNA, and 17 samples positive for influenza B. All studied A(H3N2) viruses belonged to the 3C.2a1b.2a2 subclade (Bangladesh group). The two verified A(H1N1) pdm09 influenza viruses belonged to the 6B.1A.5a clade. All studied influenza B viruses were assigned to the B/Victoria genetic lineage, and to 1A.3a2 subclade. The genomes of all identified viruses did not contain mutations of the NA gene responsible for drug resistance to neuraminidase inhibitors, or mutations in PA gene responsible for baloxavir resistance. All viruses tested by fluorescence assay were sensitive to oseltamivir and zanamivir. The worldwide frequency of influenza isolates resistant to antineuraminidase drugs does not exceed 1-2% of cases. Hence, oseltamivir and zanamivir provide effective treatment for seasonal influenza.

Keywords: influenza viruses, seasonal, population immunity, hemagglutination inhibition reaction, molecular genetic analysis, neuraminidase inhibitors, sensitivity

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания.

Введение

В конце 2019 года в Китае появился новый коронавирус (SARS-CoV-2), откуда он распространился по всему миру. Это привело к пандемии COVID-19, которая продолжается до сих пор. Начиная с февраля-марта 2020 г., резко снизилась циркуляция вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиальных вирусов, парамиксовирусов, сезонных коронавирусов, метапневмовирусов, аденовирусов. Но в то же время продолжалась циркуляция энтеровирусов/риновирусов с региональными различиями в интенсивности эпидемии [3].

В сезоне 2020-2021 регистрировались редкие случаи заболевания, вызванные вирусами гриппа А и В. Эпидемический порог не был достигнут ни в одной стране, а выявление сезонного гриппа было ниже, чем даже в обычные летние месяцы [2]. По-видимому, из-за более низкого

репродуктивного числа (R_0) вируса гриппа по сравнению с SARS-CoV-2 строгие противоэпидемические меры оказывали гораздо более эффективное влияние на снижение циркуляции вирусов гриппа [8].

В связи с этим, сложная ситуация возникла с принятием решений о составе сезонной вакцины, поскольку намного меньшее количество штаммов вирусов гриппа были генетически охарактеризованы в мире, а в период 2020-2021 годов наблюдалось возникновение и распространение новых антигенных групп вирусов гриппа А(H3N2) и гриппа В [11, 12].

Непредсказуемость течения сезона, постоянная угроза эпидемии гриппа и дополнительная опасность социркуляции вирусов гриппа и SARS-CoV-2 подчеркнула необходимость постоянного тщательного мониторинга гриппа, поскольку данные о генетической изменчивости циркулирующих штаммов, их отличии от вакцинных штаммов, характеристика лекарственной чувствительности и вирулентных свойств

необходимы для решения практических задач санитарно-эпидемиологической службы и здравоохранения России.

Эффективной формой контроля заболеваемости гриппом является вакцинация. В России накануне эпидемического сезона 2020–2021 годов было привито от гриппа 78,79 млн человек, или 53,7% населения, а накануне сезона 2021–2022 гг. было привито немногим более 40 млн человек, что составляет примерно 29% от численности населения страны [1].

Целью настоящего исследования явился анализ популяционного иммунитета к гриппу и молекулярно-генетическое исследование вирусов гриппа, выявленных в Российской Федерации в 2020–2022 гг.

Материалы и методы

Исследование популяционного иммунитета

В работе использованы диагностикумы гриппозные для проведения реакции торможения гемагглютинации сухие, производства ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», г. Санкт-Петербург, изготовленные на основе следующих штаммов вирусов гриппа А и В: А/Victoria/2570/2019 (H1N1) pdm09; А/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2); В/Washington/02/2019 (линия Виктория); В/Phuket/3073/2013 (линия Ямагата).

Транспортировку образцов в ГНЦ ВБ «Вектор» осуществляли в термоконтейнере с хладоэлементами. Собранные образцы хранили до исследования при температуре -20°C . Методика РТГА выполнялись, как описано ранее [5]. Наличие в сыворотках крови антител к разным типам/серотипам вируса гриппа тестировали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), сыворотки считали положительными, если обратный титр антител был равен или больше 40.

Для определения статистической значимости различий в титрах РТГА между группами пациентов разных регионов использовался критерий χ^2 . Расчет проводился с помощью статистического программного пакета Statistica 6.0. Значение $p < 0,05$ считалось значимым.

Выделение вируса гриппа

Выделение штаммов вирусов гриппа А и В проводили из аутопсийного материала (фрагменты бронхов, трахеи, легких) от людей, умерших предположительно от гриппа, и клинического материала (мазки из носа и зева в транспортной среде) от лиц с тяжелым течением ОРВИ, а также от первых в сезоне случаев заболевания гриппом, при вспышке гриппоподобного заболевания в коллективе и от вакцинированных против гриппа накануне эпидемии. Первичный материал собирали и тестировали в полимеразной цепной

реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) сотрудники региональных ФБУЗ Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. Все положительные образцы поступали в ГНЦ ВБ «Вектор». Результаты типирования подтверждали методом ОТ-ПЦР, с использованием наборов реагентов «РИБО-преп», «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Полученный материал использовали для выделения изолятов в клеточной культуре МДСК путем заражения монослоя клеток [5].

Чувствительность к антинейраминидазным ингибиторам

Тестирование чувствительности к ингибиторам нейраминидазы осельтамивиру и занамивиру проводили флуоресцентным методом [9]. Вирус инкубировали с антинейраминидазным препаратом в диапазоне концентраций 0,01–1000 нМ в течение 45 минут, после чего в реакцию добавляли 2-(4-метилумбеллиферил)-а-D-N-ацетилнейраминовою кислоту (MUNANA), являющуюся субстратом для нейраминидазы вирусов гриппа. Расщепление данного субстрата ферментом приводит к высвобождению флуоресцирующего продукта 4-метилумбеллиферона. Таким образом, измерение уровня флуоресценции в зависимости от разведения препарата позволяет рассчитать концентрацию антинейраминидазного препарата, снижающего активность фермента на 50% (IC_{50} , концентрация полумаксимального ингибирования).

Для интерпретации полученных значений IC_{50} использовали критерии Рабочей группы ВОЗ по мониторингу чувствительности вирусов гриппа к противовирусным средствам [7]. В соответствии с данными критериями чувствительность к препарату считается сниженной, если значение IC_{50} исследуемого штамма превосходит медиану значений IC_{50} всех протестированных вирусов данного подтипа за текущий период в 10–100 раз для вируса гриппа А и в 5–50 раз для вируса гриппа В. Чувствительность к препарату считается значительно сниженной, если значение IC_{50} исследуемого штамма превосходит медиану значений IC_{50} всех протестированных вирусов данного подтипа за текущий период более чем в 100 раз для вируса гриппа А и более чем в 50 раз для вируса гриппа В.

Молекулярно-генетическое исследование

Полногеномное и в некоторых случаях фрагментарное секвенирование вируса гриппа из первичного клинического материала и выделенных изолятов проводилось с использованием NGS на платформе MiSeq, Illumina в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Выделение РНК производилось с использованием комплекта реагентов «Рибо-сорб» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора,

Москва). Обратная транскрипция проводилась со смесью праймеров (Uni12, Uni12.4, Uni13) для образцов вируса типа А и Uni11 праймером для образцов вируса типа В используя набор реактивов ОТ-М-MuLV-RH, ООО «БИОЛАБМИКС», Россия. ПЦР для получения ампликонов проводилась с использованием набора «БиоМастер» LR HS-Taq ПЦР (2). Получение наборов ампликонов для секвенирования проводилось с использованием праймеров, последовательности которых были предоставлены ВОЗ (<http://www.who.int/>), CDC («Атланта», США). Секвенирование ампликонов покрывающих геном вируса гриппа было проведено на Illumina MiSeq с использованием MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, Сан-Диего, США). Биоинформатический анализ данных MiSeq был проведен с использованием программного обеспечения bwa-0.7.15 [6].

Результаты

Накануне эпидемического сезона 2021-2022 гг., в сентябре-ноябре 2021 года было собрано 1344 образца сыворотки крови в пяти федеральных округах: 415 образцов в Сибирском ФО, 267 образцов в Южном ФО, 250 образцов в Дальневосточном ФО, 156 в Приволжском ФО, 256 образцов в Уральском ФО. Все образцы были исследованы в РТГА с вакцинными штаммами вируса гриппа. Результаты представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, наиболее низкий популяционный иммунитет был к вакцинному штамму вируса гриппа В/Victoria, не выше 10% положительных образцов. К вирусу гриппа А иммунитет был существенно выше: против штамма А/Н3N2 от 24% до 37% в пяти ФО, против штамма А/Н1N1 pdm09 от 25% до 31% в четырех ФО и 8% в Дальневосточном ФО. Таким образом, целевого значения – около 50% иммунного населения к вакцинным штаммам вируса гриппа, накануне эпидемического сезона 2021-2022 гг. достигнуто не было.

Уровень популяционного иммунитета коррелирует с особенностями циркуляции вируса гриппа в России в 2020-2022 гг. Так, в 2020-2021 гг. была выявлена спорадическая циркуляция вирусов гриппа В. Генетический анализ 6 вирусов гриппа В показал, что все исследованные вирусы относились к генетической линии В/Victoria, кладе V1A.3 с делецией трех аминокислот в HA1 (162-164) и к субкладе V1A.3a с характерными аминокислотными заменами в HA – N150K, G184E, N197D и R279K, в которой выделились две группы 3a1 и 3a2. Два исследованных нами штамма относились к группе 3a1 с характерными заменами в HA V220M и P241Q (В/Yekaterinburg/3291V/2020, В/Yekaterinburg/3292V/2020) и четыре исследованных штамма относились к группе 3a2 с характерными заменами A127T, P144L и K203R

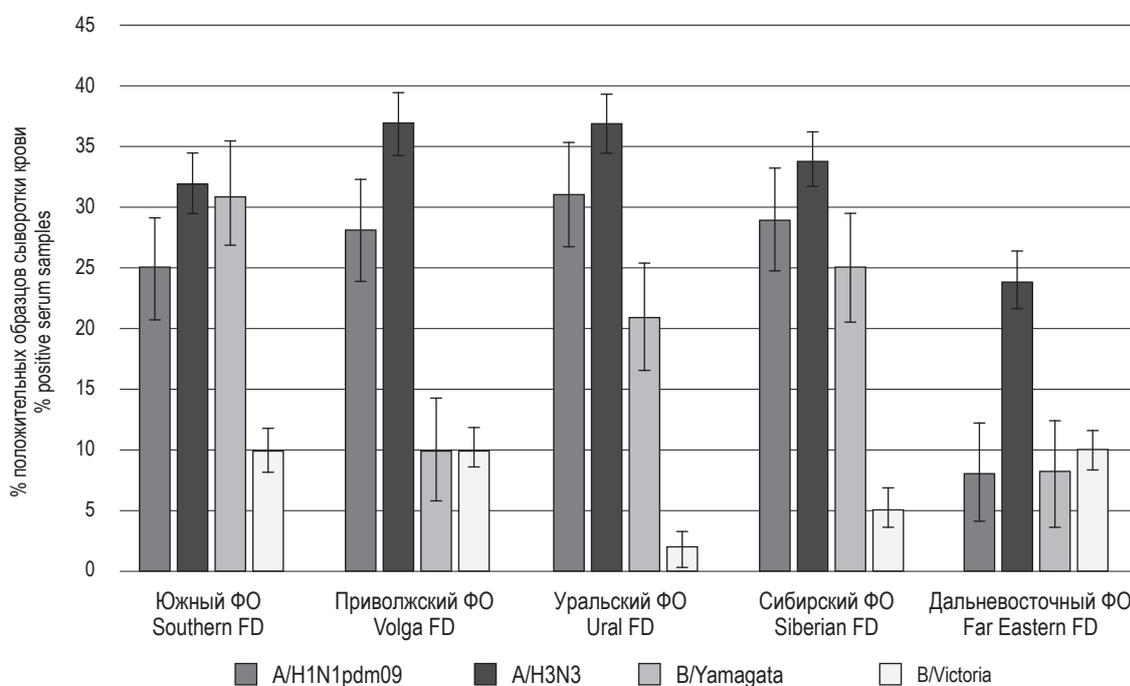


Рисунок 1. Уровень популяционного иммунитета к вакцинным штаммам вируса гриппа накануне эпидемического сезона 2021-2022 гг.

Figure 1. The level of population immunity to the influenza virus vaccine strains prior to the 2021-2022 epidemic season

(В/Rostov/340V/2021, В/Tyumen/343V/2021, В/Tyumen/3432V/2021, В/Zabaykalsky Krai/349V/2021).

С июня 2021 г. по конец февраля 2022 г. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора поступил 901 образец, положительный на присутствие РНК вируса гриппа А(Н3N2), 2 образца положительных на РНК вируса А(Н1N1)pdm09, 17 образцов положительных на грипп В. Повторное субтипирование в ГНЦ ВБ «Вектор» подтвердило присутствие РНК вируса А(Н3N2) в 838 образцах (включая 11 случаев с летальным исходом), А(Н1N1)pdm09 в 3 образцах и гриппа В генетической линии Виктория в 12 образцах (включая 1 случай с летальным исходом, отягощенный коинфицированием SARS-CoV-2). Вирусов генетической линии В/Yamagata обнаружено не было. В результате заражения культуры клеток MDCK было выделено 78 штаммов вируса А(Н3N2) и 2 штамма вируса гриппа В/Victoria.

Анализ нуклеотидной последовательности генома изолятов и вируса гриппа из первичного материала был проведен для 83 вирусов А(Н3N2), 2 вирусов А(Н1N1)pdm09 и 3 вирусов гриппа В/Victoria. Результаты анализа показали, что все исследованные вирусы А(Н3N2) принадлежали к субкладе 3С.2a1b.2a2 (А/Bangladesh/10006/2020 является референсным штаммом группы 2a2, также называемой группой Бангладеш). Мутации в НА, характеризующие эту группу, включают замены Y159N, T160I, что приводит к потере сайта гликозилирования, и замены L164Q, G186D, D190N [13]. Большинство исследованных вирусов А(Н3N2) (75 из 83) имели дополнительные мутации в НА: 53G, 156S и группу мутаций – I25V, R201K, S219Y, характерную для штаммов, циркулировавших в России в 2021 г.

Филогенетический анализ двух вирусов гриппа А(Н1N1) pdm09 показал, что они относились к кладе 6В.1А.5а с характерными заменами в НА N129D, T185I и N260D. При этом один из вирусов А/Moscow/154-161V/2021 относился к субкладе 5а1 с характерными заменами в НА D187A и Q189E, и один вирус А/Khmao/182-14V/2021 относился к субкладе 5а2 с характерными заменами в НА K130N, N156K и L161I.

Генетический анализ трех вирусов гриппа В (В/YANAO/126-03V/2021, В/Moscow/137-90V/2021, В/Volgograd/202-a104V/2021) показал, что они относились к генетической линии В/Victoria и принадлежали к субкладе 1А.3а2 (с характерными заменами A127T, P144L и K203R).

Все исследованные штаммы, выделенные нами в 2020–2022 гг., не содержали мутации в гене НА, ответственные за лекарственную устойчивость к ингибиторам нейраминидазы, или мутации в гене РА, ответственные за лекарственную устойчивость к балокавиру. Тестирование флу-

оресцентным методом чувствительности 23 изолятов вируса гриппа А(Н3N2) и 1 изолята вируса гриппа В к антинейраминидазным ингибиторам подтвердило, что все штаммы были чувствительны к препаратам озелтамивир и занамивир.

Обсуждение

В период с сентября 2020 г. по август 2021 г. активность гриппа была значительно ниже межсезонных норм, с очень низким уровнем выявления вирусов гриппа А и/или В. В Европе были выявлены только спорадические случаи гриппа с преобладанием вирусов гриппа А, при этом А(Н1N1)pdm09 выявлялся чаще, чем А(Н3N2). В целом процент положительных образцов на присутствие РНК вирусов гриппа составил менее 0,2%, притом что средний процент положительных результатов за тот же отчетный период трех предыдущих сезонов (2017–2020 гг.) составил около 17%.

В Северной Америке процент положительных тестов на вирус гриппа был очень низким, несмотря на обычные или повышенные уровни тестирования. Чаще выявлялся грипп В, гораздо реже тестировали вирус А(Н1N1)pdm09 или А(Н3N2). В Азии активность гриппа также была ниже, чем в предыдущие сезоны. В основном выделяли вирусы гриппа В, в КНДР с сентября 2020 г. по январь 2021 г. были зарегистрированы только вирусы гриппа А с преобладанием А(Н1N1)pdm09, Япония сообщила о незначительном повышении циркуляции вируса гриппа А(Н3N2) на 5-й неделе 2021 г. [11].

В период с сентября 2021 г. по январь 2022 г. уровень гриппа был значительно выше, в целом процент положительных тестов на вирусы гриппа за этот период составил немногим менее 3%. По сравнению с сезоном 2020–2021 гг. во многих странах умеренного климата сообщили о более чем 2,5-кратном увеличении количества тестированных образцов и более чем 35-кратном увеличении числа выявленных маркеров вируса гриппа. В Северной Африке преобладал вирус А(Н3N2). В большинстве стран Азии выявляли вирусы гриппа А и В с преобладанием вирусов А(Н3N2). В Китае выявляли почти исключительно грипп В. В большинстве стран Европы и Северной Америки преобладал грипп А(Н3N2), однако сообщалось и о циркуляции вирусов гриппа В. Во Франции преобладал грипп А(Н1N1) pdm09 [15].

Вирусы гриппа линии В/Victoria, выделенные в Китае в период пандемии COVID-19, отличались значительным генетическим разнообразием. Наиболее распространены были вирусы группы 1А.3а. Эта группа далее диверсифицировалась на 2 подгруппы, вирусы подгруппы 1А.3а1 имели замены либо V220M и P241Q, которые преоб-

ладали и наблюдались почти исключительно в Китае, либо 1A.3a2 с дополнительными аминокислотными заменами A127T, P144L и K203R [4]. Подгруппа 1A.3a2 демонстрирует дальнейшую генетическую дифференциацию с дополнительными аминокислотными заменами HA, обнаруженными в вирусах, выделенных в разных регионах мира [14]. Для большинства вирусов группы 1A.3a наблюдалось снижение вируснейтрализации постинфекционными антисыворотками хорьков, полученными против вирусов 1A.3, таких как V/Washington/02/2019 (компонент гриппозной вакцины для Северного полушария 2020–2021 гг. и 2021–2022 гг.) [10].

Филогенетический анализ гена HA вирусов A(H3N2), выделенных в мире во второй половине 2021 г., показал, что подавляющее большинство из них попало в генетическую кладу 3C.2a1b.2a.2 (2a.2) с заменами HA1 Y159N, T160I (что привело к потере сайта гликозилирования), L164Q, G186D, D190N, F193S и Y195F. Субклада 2a.2 далее диверсифицировалась в генетические группы, содержащие замены H156Q, H156S и D53G или H156S и D53N. Также были обнаружены вирусы из трех других ветвей HA: 3C.2a1b.1a (1a) с заменами T135K (потеря сайта гликозилирования), A138S, G186D, D190N, F193S и S198P; 3C.2a1b.1b (1b) с заменами T135K (потеря сайта гликозилирования), S137F, A138S и F193S; и 3C.2a1b.2a.1 (2a.1 Камбоджа) с заменами G186S, F193S, Y195F и S198P. Вирусы с гемагглютинином группы 1b преобладали в африканских странах (Кот-д’Ивуар, Мадагаскар, Нигер и Южная Африка) и спорадически выявлялись в очень небольшом количестве в Армении, Австралии и Великобритании. Вирусы из группы 1a были обнаружены в Эфиопии, Италии, Швеции и Того. Вирусы из группы 2a.2 (Бангладеш), антигенно отличающейся от группы 2a.1 (Камбоджа), стали преобладать в мире и были обнаружены во всех регионах мира, включая Россию [15]. На встрече ВОЗ по определению состава сезонной гриппозной вакцины для Южного полушария на 2022 г. штамм A/Hong Kong/45/2019 (группа 1b) был заменен на штамм A/Darwin/6/2021 (H3N2) из группы 2a2 (Бангладеш). В вакцине для Северного полушария на сезон 2022–2023 гг. штамм A/Cambodia/E0826360/2020 (группа 2a1) был заменен на антигенно более близкий к циркулирующим вирусам штамм A/Darwin/6/2021 (H3N2) из группы 2a2 (Бангладеш) [13].

В России сезон гриппа 2020–2021 гг. характеризовался крайне низким выявлением случаев заболевания гриппом. В период с сентября 2020 г. по май 2021 г. была выявлена только спорадическая циркуляция вирусов гриппа В и гриппа А(H3N2) (по данным ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, ЦНИИ Эпидемиологии и ФГБУ НИИ

гриппа доступным в GISAID). Случаев заболевания гриппом с летальным исходом зафиксировано не было. Все штаммы гриппа В принадлежали генетической линии В/Victoria группам V1A.3a1 и V1A.3a2, с преобладанием субклады V1A.3a2. Все исследованные в России вирусы А(H3N2) за этот период принадлежали новой антигенной группе 3C.2a1b.2a2 (за весь период всего три вируса по данным GISAID).

Продолжение мониторинга в летний период (с июня по август, 2021 г.) выявило спорадическую циркуляцию вируса А(H3N2). Неэпидемический подъем заболеваемости наблюдался в сентябре–октябре 2021 г., что, возможно, явилось ранним началом сезона 2021–2022 гг. Следует отметить, что 72% образцов от пациентов с гриппоподобным заболеванием и 6 случаев с летальным исходом, поступивших в ГНЦ ВБ «Вектор» в 2021–2022 гг., относились к детской возрастной категории от 0 до 17 лет, а 20% всех образцов пришлось на категорию детей до 5 лет.

Анализ геномов вируса гриппа А(H3N2), доминирующего в циркуляции гриппа в России, выявил их принадлежность к группе 3C.2a1b.2a2, преобладавшей в циркуляции в мире. Группа 2a2 имеет ряд мутаций в HA, которые могут быть ассоциированы с изменением антигенных свойств по сравнению с вакцинным штаммом A/Cambodia/e0826360/2020 (группа 2a1). Только два вируса субтипа А(H1N1)pdm09 были генетически проанализированы в России и они принадлежали двум субкладам 6В.1А.5а1 и 6В.1А.5а2. Вирусы, принадлежащие к обеим субкладам, циркулировали спорадически в разных географических точках мира в течение 2021–2022 гг. [13]. В эпидсезоне 2021–2022 гг. грипп В циркулировал в России спорадически и все исследованные штаммы вируса гриппа В (всего 10 штаммов по данным ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, ЦНИИ Эпидемиологии и ФГБУ НИИ гриппа, доступным в GISAID) принадлежали субкладе генетической линии В/Victoria и группе V1A.3a2, которая доминировала в мире [13]. Вирусов В/Yamagata в России и в мире в 2021–2022 гг. обнаружено не было.

В целом циркулировавшие сезонные вирусы гриппа были генетически сходны с вакцинными штаммами, наличие дополнительных аминокислотных замен связано с антигенным дрейфом. Все тестированные флуоресцентным методом штаммы были чувствительны к антинеираминидазным препаратам озелтамивиру и занамивиру.

Заключение

В профилактике гриппа вакцинация остается самым эффективным средством. В связи с этим стоит обратить внимание, что антиген-

ный дрейф вирусов гриппа А(Н3N2) и В/Victoria привел к тому, что Всемирная организация здравоохранения рекомендовала заменить сразу два вакцинных штамма в гриппозной вакцине 2022–2023 гг. (новые вакцинные штаммы – А/Darwin/9/2021 (Н3N2), В/Austria/1359417/2021 линия В/Victoria). Кроме того, популяционный иммунитет к гриппу В накануне последних эпидсезонов 2017–2022 гг. был на уровне 10–30% серопозитивных, а циркуляции штаммов В/Ямагата в течение 2020–2022 гг. фиксировали крайне редко (менее 0,1% от всех подтвержденных случаев). Следовательно, социально значимые последствия от эпидемии гриппа в 2022–2023 гг. во мно-

гом будут зависеть от кампании по вакцинации населения осенью 2022 года. Антинейраминидазные препараты остаются весьма эффективным средством для лечения сезонного гриппа, устойчивые к ним изоляты выявляются не чаще, чем в 1–2% случаев.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность коллегам из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» субъектов РФ за сбор и своевременную и качественную доставку в ГНЦ ВБ «Вектор» клинических образцов.

Список литературы / References

1. Демидов А. Роспотребнадзор назвал число привитых от гриппа россиян // Газета.ru, 2021. – 9 нояб. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.gazeta.ru/social/news/2021/11/09/n_16821619.shtml?updated (Дата обращения: 26.04.2022). [Demidov A. Rospotrebnadzor named the number of Russians vaccinated against influenza. *Gazeta.ru*, 2021, 9 Nov. [Electronic resource]. Access mode: https://www.gazeta.ru/social/news/2021/11/09/n_16821619.shtml?updated (Date of application April 26, 2022).
2. Adlhoch C., Mook P., Lamb F., Ferland L., Melidou A., Amato-Gauci A.J., Pebody R., European Influenza Surveillance Network. Very little influenza in the WHO European Region during the 2020/21 season, weeks 40 2020 to 8 2021. *Euro Surveill.*, 2021, Vol. 26, no. 11, 2100221. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.11.2100221.
3. Groves H.E., Piche-Renaud P., Peci A., Farrar D.S., Buckrell S., Bancej C., Sevenhuysen C., Campigotto A., Gubbay J.B., Morris S. The impact of the COVID-19 pandemic on influenza, respiratory syncytial virus, and other seasonal respiratory virus circulation in Canada: A population-based study. *Lancet Reg. Health Am.*, 2021, Vol. 1, 100015. doi: 10.1016/j.lana.2021.100015.
4. Huang W., Li X., Tan M., Cheng Y., Chen T., Wei H., Zeng X., Xie Y., Liu J., Xiao N., Yang L., Wang D. Epidemiological and Virological Surveillance of Seasonal Influenza Viruses – China, 2020–2021. *China CDC Wkly*, 2021, Vol. 3, no. 44, pp. 918–922.
5. Kolosova N.P., Ilyicheva T.N., Danilenko A.V., Bulanovich J.A., Svyatchenko S.V., Durymanov A.G., Goncharova N.I., Gudymo A.S., Shvalov A.N., Susloparov I.M., Marchenko V.Y., Tregubchak T.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Severe cases of seasonal influenza in Russia in 2017–2018. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 7, e0220401. doi: 10.1371/journal.pone.0220401.
6. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv: Genomics*, 2013. doi: 10.48550/arXiv.1303.3997.
7. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. *Weekly Epidemiol. Rec.*, 2012, Vol. 87, no. 39, pp. 369–374.
8. Petersen E., Koopmans M., Go U., Hamer D.H., Petrosillo N., Castelli F., Storgaard M., Al Khalili S., Simonsen L. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, Vol. 20, no. 9, pp. e238–e244.
9. Svyatchenko S.V., Goncharova N.I., Marchenko V.Yu., Kolosova N.P., Shvalov A.N., Kovrizhkina V.L., Durymanov A.G., Onkhonova G.S., Tregubchak T.V., Susloparov I.M., Gudymo A.S., Ilyicheva T.N., Ryzhikov A.B. An influenza A(H5N8) virus isolated during an outbreak at a poultry farm in Russia in 2017 has an N294S substitution in the neuraminidase and shows reduced susceptibility to oseltamivir. *Antiviral Res.*, 2021, Vol. 191, 105079. doi: 10.1016/j.antiviral.2021.105079.
10. Weekly Epidemiological Record. 22 October 2021, Vol. 96, no. 42, pp. 509–520.
11. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2021–2022 northern hemisphere influenza season (Feb 2021). Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-northern-hemisphere-recommendation-2021-2022/202102_recommendation.pdf?sfvrsn=2af603d8_12&download=true (last updated: 28.04.2022).
12. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2022 southern hemisphere influenza season (Sept 2021). Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2022-southern-hemisphere-influenza-season> (last updated: 28.04.2022).
13. WHO, February 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2022-2023-northern-hemisphere-influenza-season> (last updated: 25.04.2022).

14. WHO Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2022 southern hemisphere influenza season. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphere-recommendation-2022/202109_recommendation.pdf?sfvrsn=698a54b9_12&download=true (last updated: 25.04.2022).

15. WHO Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2022-2023 northern hemisphere influenza season. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-northern-hemisphere-recommendation-2022-2023/202202_recommendation.pdf?sfvrsn=5c88e006_13&download=true (last updated: 25.04.2022).

Авторы:

Колосова Н.П. — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Ильичева Т.Н. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Святченко С.В. — младший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Даниленко А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Онхонова Г.С. — младший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Иванова К.И. — старший лаборант-исследователь ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Суслопаров И.М. — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Рыжиков А.Б. — к.б.н., заведующий отделом ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Kolosova N.P., PhD (Biology), Leading Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ilicheva T.N., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Svyatchenko S.V., Junior Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Danilenko A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Onkhonova G.S., Junior Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ivanova K.I., Senior Research Laboratory Assistant, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Susloparov I.M., PhD (Biology), Senior Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ryzhikov A.B., PhD (Biology), Head of Department, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ TREC И KREC У ЛИЦ СТАРШЕ 18 ЛЕТ

**Сайтгалина М.А.¹, Любимова Н.Е.¹, Останкова Ю.В.¹,
Кузнецова Р.Н.^{1,2}, Тотолян Арег А.^{1,2}**

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Все большее внимание обращают на себя способы выявления первичных и вторичных Т- и/или В-клеточных иммунодефицитов, внедрение которых в лабораторную диагностику способствовало бы скорейшему выявлению иммунодефицитных состояний. В настоящее время неуклонно увеличивается количество выявленных взрослых больных с иммунодефицитами различного генеза. Поскольку пол, возраст и раса пациентов могут являться значимыми факторами состояния иммунитета, определение популяционных референтных интервалов содержания молекул TREC и KREC в периферической крови взрослой популяции для дальнейшего выявления и углубленного обследования сложных случаев как врожденных, так и приобретенных иммунодефицитных состояний является актуальной задачей современной молекулярно-генетической лабораторной диагностики. Цель — определить референтные интервалы количественного содержания фрагментов ДНК TREC и KREC в периферической крови среди взрослого населения Санкт-Петербурга.

Использовали образцы цельной крови, полученные от 717 условно здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 108 лет в рамках программы оценки популяционного иммунитета жителей Санкт-Петербурга. Критерием исключения добровольца из исследования являлось наличие диагноза иммунодефицит любого генеза, вирусный гепатит А, В, С, ВИЧ-инфекция. Определение количественного содержания целевых фрагментов ДНК TREC и KREC проводили с использованием набора реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-AMP PS). Определение референтных интервалов прямым методом проводили согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008.

В рамках исследования добровольцы были разделены на шесть возрастных групп: 18-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет, 60-69 лет и лица старше 70 лет. Определено количественное содержание молекул TREC и KREC в каждом образце крови для всех групп. Корреляционный анализ позволил

Адрес для переписки:

Сайтгалина Мария Александровна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (981) 834-66-32.
E-mail: Sajgalinam@mail.ru

Address for correspondence:

Maria A. Saitgalina
Saint Petersburg Pasteur Institute
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: +7 (981) 834-66-32.
E-mail: Sajgalinam@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Сайтгалина, Н.Е. Любимова, Ю.В. Останкова, Р.Н. Кузнецова, Арег А. Тотолян «Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1227-1236. doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587

© Сайтгалина М.А. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Saitgalina, N.E. Liubimova, Yu.V. Ostankova, R.N. Kuznetsova, Areg A. Totolian "Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1227-1236. doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587

© Saitgalina M.A. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DOR-2587

установить отрицательную зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови с возрастом участников исследования (коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,80$ (p -value $< 0,0001$)). Выявлены достоверные различия в уровнях TREC между разными возрастными группами. Корреляционной зависимости содержания молекул KREC в образцах крови от возраста и различий между возрастными группами не установлено. Определены референсные интервалы уровня TREC для каждой выделенной возрастной группы. Для всех групп установлен единый референсный интервал уровней молекул KREC. Определенные РИ TREC и KREC у взрослых людей значительно ниже, чем у новорожденных.

Полученные результаты, позволившие определить референсные интервалы уровней TREC и KREC для взрослых людей, будут способствовать эффективной персонифицированной лабораторной диагностике иммунодефицитных состояний различного генеза.

Ключевые слова: иммунный статус, иммунодефицит, TREC, KREC, метод диагностики, референсный интервал

DETERMINATION OF REFERENCE VALUES FOR TREC AND KREC IN CIRCULATING BLOOD OF THE PERSONS OVER 18 YEARS

Saitgalina M.A.^a, Liubimova N.E.^a, Ostankova Yu.V.^a,
Kuznetsova R.N.^{a, b}, Totolian Areg A.^{a, b}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Increasing attention is being paid to methods for detecting primary and secondary T and/or B cell immunodeficiencies. Their implementation into laboratory diagnostics would contribute to the early diagnostics of immunodeficiencies. Currently, the number of identified adult patients with immunodeficiencies of various origins is steadily increasing. Age, gender and ethnicity of patients may be significant factors of immunity. Hence, determination of the population reference intervals for TREC and KREC DNA excision rings in peripheral blood of adult persons is an urgent laboratory task for in-depth examination of both congenital and acquired immunodeficiency conditions. Our purpose was to determine the reference intervals for the quantitative assay of TREC and KREC fragments in peripheral blood among the adult population of St. Petersburg.

We studied whole blood samples obtained from 717 apparently healthy volunteers aged 18 to 108 years within the program of population immunity assessment among residents of St. Petersburg. The exclusion criterion included immunodeficiency of any origin, viral hepatitis A, B, C, HIV infection. Quantitation of the target TREC and KREC DNA fragments was carried out using a set of reagents for the quantitative determination of excisional rings TREC and KREC by Real-time PCR (TREC/KREC-AMP PS). The reference intervals were determined by the direct method according to the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry and the Russian State Standard (GOST) R 53022.3-2008.

The volunteers were divided into six age groups: 18-29, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69 years old, and the persons over 70. The amounts of TREC and KREC in each blood sample were determined for all age groups. Upon correlation analysis, we have revealed a negative relationship between the concentration of TREC molecules in blood samples, and the age of study participants (Spearman correlation coefficient $r = -0.80$ (p -value < 0.0001)). Significant differences in TREC levels between different age groups were revealed. No correlations were detected between KREC contents in blood samples and age as well as any differences between age groups. Reference intervals of the TREC level were determined for each mentioned age group. A unified reference range was established for the KREC levels. The established reference intervals for TREC and KREC molecules in adults are significantly lower than in newborns.

The obtained results enable determination of reference intervals for TREC and KREC levels among adults, thus contributing to effective personalized laboratory diagnosis of immunodeficiency states of various origins.

Keywords: immune status, immunodeficiency, TREC, KREC, diagnostic method, reference interval

Введение

Иммунодефицит является результатом недостаточности или отсутствия элементов иммунной системы, включая лимфоциты, фагоциты и систему комплемента [5]. Иммунодефициты представляют собой широкий спектр наследственных (первичных) и приобретенных (вторичных) состояний, характеризующихся специфическими аномалиями, затрагивающими множество гуморальных, клеточных и фагоцитарных иммунологических путей. Первичные иммунодефициты (ПИД) обусловлены генетическими дефектами, в то время как вторичные могут быть следствием развития заболевания (синдром приобретенного иммунодефицита – СПИД), вызванного инфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), а также могут быть связаны с иммуносупрессивной терапией или лечением глюкокортикоидами, например, у пациентов с онкологическими заболеваниями или после трансплантации паренхиматозных органов, стволовых клеток. Вторичные иммунодефициты могут быть следствием операций, травм, экстремальных условий окружающей среды, недоедания, что в конечном итоге неблагоприятно влияет на иммунные реакции организма и повышает риск инфекций [27].

На сегодняшний день известно более 450 форм генетически подтвержденных ПИД, среди которых выделяют заболевания с дефицитом Т-клеток, дефицитом В-клеток (преобладающая группа), комбинированным дефицитом Т- и В-клеток [25]. Клиническая тяжесть колеблется от легкой до потенциально опасной для жизни. Учитывая, что симптомы ПИД не являются специфичными, значимой проблемой данной группы заболеваний остается гиподиагностика – большинство ПИД скрыты под маской других диагнозов [22]. Данное обстоятельство приводит к несвоевременному и неадекватному лечению, а у пациентов с тяжелыми формами ПИД к 100%-ной летальности. Однако из-за разнообразия клинической картины ПИД с относительно легким течением заболевания могут оставаться не выявленными в детском возрасте. При первичном выявлении заболеваний у взрослых пациентов определяют разнообразную и преимущественно сглаженную клиническую картину, например селективный IgA-дефицит, общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН), являющиеся наиболее частыми формами ПИД у лиц старше 18 лет. Согласно некоторым исследованиям, из-за задержки диагностики, ОВИН впервые может быть установлен в возрасте 35 лет и старше. Характер клинических проявлений патологии у пациентов индивидуален и отличается вариабельностью течения даже в рамках одной нозологической формы [4]. Несмотря на то,

что состояния, связанные с гипогаммаглобулинемией, можно определить после исключения, согласно возрасту, транзиторной младенческой гипогаммаглобулинемии [3]. Однако в редких случаях у взрослых пациентов могут быть выявлены более тяжелые формы ПИД, например синдром Ди Джорджи [4]. Диагностика таких ПИД, которые впервые дебютируют или выявляются в подростковом и взрослом возрасте, в основном строится на исследовании клинической картины, анамнеза и исключении вторичной причины снижения уровней сывороточных иммуноглобулинов, оценке их количества в крови и проведении проточной цитометрии для количественной оценки имеющих поверхностно-мембранные Ig субпопуляции В-лимфоцитов в периферической крови.

В связи с вышесказанным, все большее внимание обращают на себя способы выявления первичных и вторичных Т- и/или В-клеточных иммунодефицитов, внедрение которых в лабораторную диагностику способствовало бы скорейшему выявлению иммунодефицитных состояний и при этом не требовало бы дополнительного оборудования помимо рутинно используемого в лабораторной практике.

Как известно, Т- и В-лимфоциты берут свое начало в костном мозге от гемопоэтических стволовых клеток. И Т-, и В-клеточное звено характеризуются двухэтапным процессом дифференцировки, включающим антиген-независимую и антиген-зависимую фазы. В результате антиген-независимой дифференциации В-клеток в костном мозге и Т-клеток в тимусе образуются лимфоциты, несущие сформированный В- и Т-клеточный рецепторы соответственно. Изначально пул генов, кодирующих эти рецепторы, состоит из повторяющихся сегментов, принадлежащих трем классам: V (variable)-, D (diversity), J (joining), и не содержит функционально активного первого экзона, с которого могла бы осуществляться транскрипция мРНК рецептора. В ходе антиген-независимой дифференцировки происходит поэтапная перестройка указанных генов – процесс, называемый V(D)J-реаранжировкой или V(D)J-рекомбинацией. В результате часть генетического материала удаляется, а оставшиеся генные сегменты (по одному из каждого класса) соединяются вместе и формируют последовательность с функционально активным экзоном. С такой объединенной последовательности сегментов V(D)J в дальнейшем будет транскрибироваться мРНК Т-клеточного рецептора/вариабельных доменов В-клеточного рецептора или антитела [13, 14, 17]. ДНК-последовательность, которая удаляется из генома в ходе V(D)J-рекомбинации как побоч-

ный продукт, замыкается и существует в виде небольших колец эписомальной ДНК. Эти кольцевые молекулы ДНК носят название Т-клеточные рецепторные эксцизионные кольца TREC (T-cell receptor excision circles) и каппа рекомбинационные эксцизионные кольца (по названию каппа-цепи В-клеточного рецептора) KREC (Kappa-deleting recombination excision circles) [17]. Молекулы TREC и KREC являются стабильными и не деградируют в периферической крови, кроме того TREC не реплицируются с последующим делением Т-лимфоцитов. Таким образом, кольцевые ДНК-молекулы TREC и KREC являются маркерами зрелых наивных Т- и В-лимфоцитов соответственно, удачно завершивших процессы перестройки генетических кластеров своих рецепторов и недавно мигрировавших из тимуса и костного мозга [30]. Таким образом, уровни молекул TREC и KREC в периферической крови могут позволить определить иммунный статус пациента. Так, дефицит молекул TREC и KREC в периферической крови наблюдается при достаточно обширном перечне заболеваний и состояний и может служить прогностическим маркером не только для ряда первичных, но и для вторичных иммунодефицитов [28, 29, 31, 33]. Исходя из этого, при диагностически сложных случаях, затрагивающих дефицит Т- и В-клеток, информативным методом молекулярной диагностики является количественная оценка циркулирующих в кровотоке пациента кольцевых ДНК-молекул TREC и KREC. Описано применение анализа уровней TREC и KREC у взрослых пациентов с ОВИН и выявление его связи с тяжестью течения заболевания [16]. Уровни TREC достоверно снижены у взрослых больных с синдромом Ди Джорджи при нормальных уровнях KREC [9]. Показана диагностическая значимость определения уровней TREC и KREC с тяжелыми заболеваниями инфекционной природы [7, 10, 12, 18, 20].

В настоящее время неуклонно увеличивается количество выявленных взрослых больных с иммунодефицитными состояниями различного генеза. Во-первых, это связано с тем, что усовершенствование методов лабораторной диагностики и постоянное развитие материально-технического оснащения медицинских центров позволяют диагностировать взрослых пациентов. Во-вторых, современные подходы к терапии существенно увеличивают продолжительность жизни больных [32].

Поскольку пол, возраст и раса пациентов могут являться значимыми факторами состояния иммунитета, определение популяционных референтных интервалов содержания молекул TREC и KREC в периферической крови взрослой популяции для дальнейшего выявления и углубленно-

го обследования сложных случаев как врожденных, так и приобретенных иммунодефицитных состояний и своевременного назначения адекватной терапии, является актуальной задачей современной молекулярно-генетической лабораторной диагностики.

Цель настоящей работы – определить референтные интервалы количественного содержания фрагментов ДНК TREC и KREC в периферической крови среди взрослого населения Санкт-Петербурга.

Материалы и методы

В работе использовали образцы цельной крови, полученные от 717 условно здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 108 лет в медицинском центре ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» в рамках программы оценки популяционного иммунитета жителей Санкт-Петербурга. Критерием исключения добровольца из исследования являлось наличие диагноза иммунодефицит любого генеза, вирусный гепатит А, В, С, ВИЧ-инфекция.

Взятие крови осуществляли из локтевой вены одноразовой иглой в вакуумные одноразовые пробирки, содержащие антикоагулянт этилендиаминтетрауксусная дикалиевая или трикалиевая соль (6% ЭДТА). Пробирку с закрытой крышкой аккуратно переворачивали несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. Образец центрифугировали 5 минут при ускорении 1200 об/мин для разделения цельной крови на фракции: плазму (верхний слой), красный осадок (нижний слой) и лейкоцитарное кольцо на границе двух фаз. Лейкоцитарное кольцо отбирали и проводили экстракцию ДНК с помощью набора «РИБО-преп» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва).

Определение количественного содержания целевых фрагментов ДНК TREC и KREC в образцах тотальной ДНК проводили с использованием набора реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-AMP PS). ПЦР проводили на амплификаторах с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам HEX, FAM, ROX и Cy5 планшетного типа (CFX96). Уровни ДНК TREC и KREC рассчитывали с помощью калибровочных графиков, относительно эталонных генов эндогенного внутреннего контроля RPP30 и HPRT [4].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5 и Microsoft Excel 2010. Нормальность

распределения полученных числовых данных проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента Спирмена, значение которого оценивали по шкале Чеддока. Для оценки статистически значимых различий между отдельными выборками применяли критерий Манна–Уитни, а также ROC-анализ.

Определение референтных интервалов прямым методом проводили согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry – IFCC) и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008 [1, 8, 23].

Результаты

Перед началом исследования все добровольцы были разделены на шесть возрастных групп: 18-29 лет ($n = 120$), 30-39 лет ($n = 118$), 40-49 лет ($n = 132$), 50-59 лет ($n = 135$), 60-69 лет ($n = 111$), и лица старше 70 лет ($n = 101$), где n – количество человек в группе.

С помощью описанного метода ПЦР в режиме реального времени было определено количественное содержание молекул TREC и KREC в каждом образце крови для всех групп.

Нормальность распределения полученных числовых значений в каждой возрастной группе, как было сказано выше, проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Согласно проведенному анализу, ни в одной из выборок распределение числовых данных не подчинялось закону нормального рас-

пределения. Все последующие статистические расчеты были выполнены с применением инструментов непараметрической статистики.

Корреляционный анализ позволил установить отрицательную зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови с возрастом участников исследования (рис. 1А). При этом коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,80$ ($p\text{-value} < 0,0001$), что говорит о высокой значимой отрицательной корреляции значений TREC с возрастом (согласно шкале Чеддока).

Кроме того, попарное сравнение возрастных групп с применением критерия Манна–Уитни позволило выявить достоверные различия в количественном содержании молекул TREC в образцах между разными возрастными группами (рис. 1Б).

На рисунке 1Б обозначены сравниваемые возрастные группы. Для каждого попарного сравнения указано $p\text{-value}$, которое всегда принимало значение $< 0,05$, что свидетельствует о статистически значимой разнице значений аналита в указанных выборках.

При этом корреляционная зависимость содержания молекул KREC в образцах крови от возраста не установлена (рис. 2А). Коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,007$ ($p\text{-value} = 0,9530$), что свидетельствует об отсутствии значимой корреляции значений KREC с возрастом.

Статистически значимые различия между возрастными группами по критерию KREC также не выявлены (рис. 2Б).

При попарном сравнении возрастных групп по критерию KREC $p\text{-value}$ всегда принимало

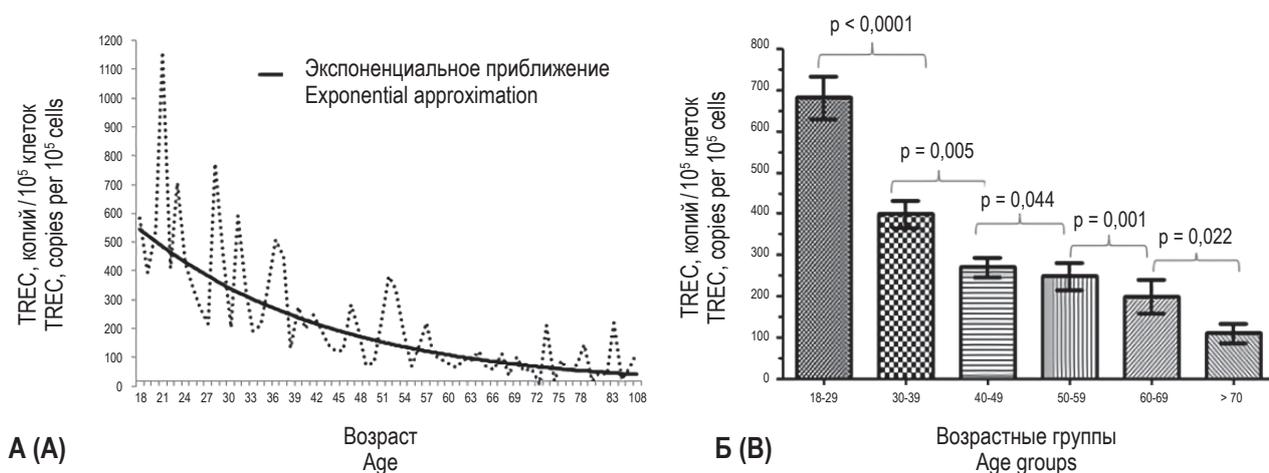


Рисунок 1. А – обратная зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови от возраста. Б – количественное содержание молекул TREC в образцах крови разных возрастных групп

Figure 1. (A), inverse relationship between number of TREC molecules in the blood samples and the age groups of population. (B), the diagram of the quantitative content of TREC molecules in samples of the different age groups

значения, превышающие 0,05 (на рисунке не отобрано).

Для каждого описанного попарного сравнения возрастных групп был проведен ROC-анализ. Он позволяет оценить качество бинарной классификации путем построения графика (ROC-кривой) зависимости чувствительности от значения «1 минус специфичность». Важным статистическим показателем является величина площади под ROC-кривой. Чем больше эта площадь, тем качественнее классификатор. Величина площади, принимающая значения больше 0,5, говорит о применимости выбранного метода классификации (в данном случае о применимости обособления двух сравниваемых возрастных групп относительно заданного критерия).

Площадь под ROC-кривой при оценке возрастных групп по параметру TREC во всех случаях принимала значение, превышающее значение 0,5: от 0,57 до 0,70. При этом наибольшее значение площади было установлено при сравнении возрастных групп 18-29 лет и 30-39 лет (0,70), что говорит о наиболее значимых различиях по параметру TREC между этими группами (рис. 3А). Нужно отметить, что результаты ROC-анализа совпали с результатами сравнения возрастных групп по уровню TREC с применением критерия Манна–Уитни.

В случае сравнения выделенных возрастных групп по уровню KREC при построении ROC-кривых, площадь под кривой всегда принимала значение, близкое к 0,5 (0,50-0,52), за исключением сравнения самых старших возрастных групп 60-69 и > 70 лет, где это значение достигло 0,58 (рис. 3Б). Полученные значения площадей, близкие к значению 0,5, говорят об отсутствии статистически значимых различий между воз-

растными группами по критерию KREC, за исключением двух самых старших возрастных выборок.

Для прямого установления референтных интервалов (РИ), согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry – IFCC) и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008, статистически достаточной является выборка, включающая 120 практически здоровых человек, по результатам исследования которых рассчитывают 95% доверительный интервал [2].

Поскольку анализируемые числовые данные не подчиняются закону нормального распределения, РИ были рассчитаны непараметрическим методом согласно рекомендациям IFCC. Для этого все полученные числовые данные исследуемого параметра были ранжированы от меньшего к большему и определены выбросы – значения анализа, существенно отличающиеся от общего массива данных (для каждой возрастной группы при анализе значений TREC и для всего массива данных при анализе значений KREC). Для принятия решения об исключении значения применяли правило Dixon/Reed. Согласно этому правилу вычисляли отношение разницы значений между предположительно выпадающим значением и соседним к нему референтным значением (P3) к разнице между крайними значениями всего полученного диапазона. Если полученное значение превышало или равнялось 0,3, то данное выпадающее значение подлежало исключению из референтной выборки. После исключения всех выбросов определяли 95% доверительный интервал [2].

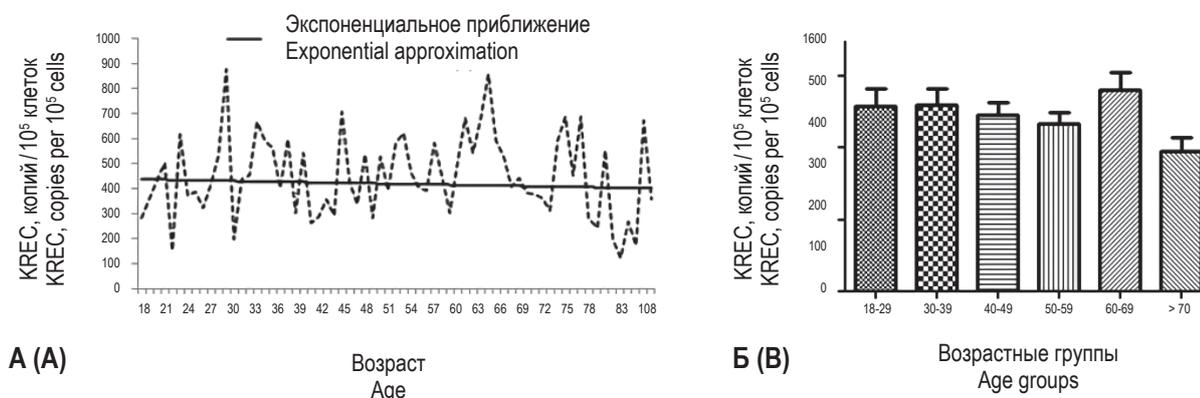


Рисунок 2. А – зависимость концентрации молекул KREC в образцах крови от возраста. Б – количественное содержание молекул KREC в образцах крови разных возрастных групп

Figure 2. (A), relationship between number of KREC molecules in the blood samples and the age groups of population. (B), the diagram of the quantitative content of KREC molecules in samples of the different age groups

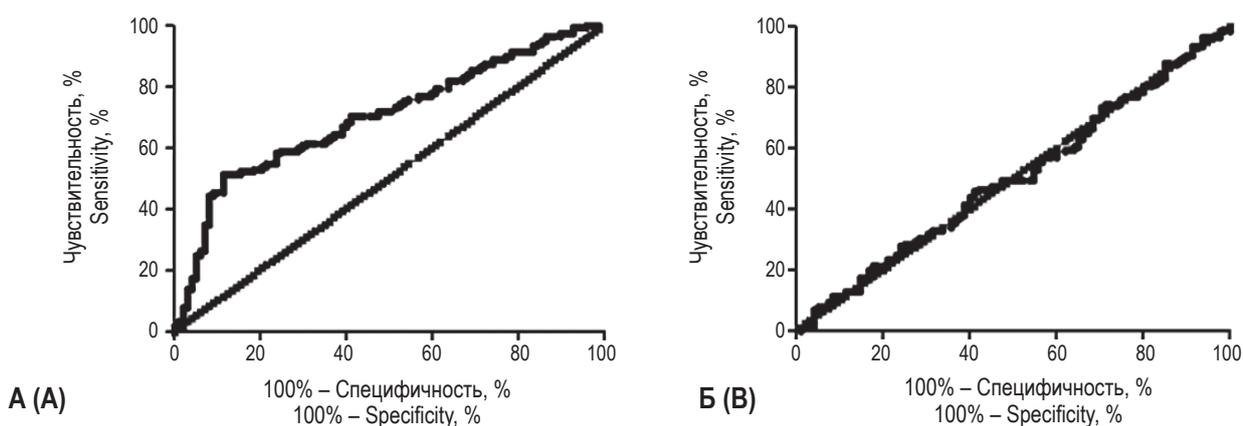


Рисунок 3. ROC-кривые, построенные при сравнении возрастных групп 18-29 лет и 30-39 лет: А – по параметру TREC; Б – по параметру KREC

Примечание. ROC-кривая на рисунке 3Б практически сливается с диагональной линией идентичности.

Figure 3. ROC-curves constructed when comparing the age groups of 18-29 years and 30-39 years: (A), according to the TREC parameter; (B) according to the KREC parameter

Note. ROC-curve is almost the same as the diagonal line of identity in figure 3B.

ТАБЛИЦА 1. РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ КОЛИЧЕСТВА МОЛЕКУЛ TREC ДЛЯ КАЖДОЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ (ЗНАЧЕНИЯ УКАЗАНЫ В КОПИЯХ TREC НА 10⁵ КЛЕТОК)

TABLE 1. REFERENCE RANGE FOR THE NUMBER OF TREC MOLECULES FOR THE EACH AGE GROUP (VALUES ARE GIVEN IN COPIES OF TREC PER 10⁵ CELLS)

	18-29 лет 18-29 years old	30-39 лет 30-39 years old	40-49 лет 40-49 years old	50-59 лет 50-59 years old	60-69 лет 60-69 years old	> 70 лет over 70 years old
Медиана Median	553,30	252,70	191,30	131,10	74,87	44,71
Нижняя граница Lower bound of the range	44,91	23,60	18,27	13,98	12,54	11,43
Верхняя граница Upper bound of the range	2135,00	1597,00	1098,00	1543,00	1715,00	683,10

Для значений аналита TREC были установлены РИ для каждой возрастной группы (табл. 1).

Поскольку статистически значимой разницы в числовых значениях аналита KREC между возрастными группами не выявлено, для этого параметра рассчитан единый РИ: 49,90-1478,00 копий/10⁵ клеток (медиана 385,7 копий/10⁵ клеток).

Надо отметить, что для новорожденных нижняя граница нормы уровней TREC принимает значение 892,6 копий/10⁵ клеток, а уровней KREC – 400,4 копий/10⁵ клеток (рассчитаны аналогичным образом).

Обсуждение

Полученные нами данные о снижении уровня TREC с возрастом не противоречат результатам зарубежных исследователей, согласно которым возраст обратно коррелирует с количеством

TREC [19]. Сходные данные были показаны в исследовании Kwok и соавт. [17]. Однако мы не выявили корреляции уровней KREC с возрастом у взрослых людей, в то время как Kwok и соавт. указывали на сравнительно более низкие уровни KREC для одних возрастных групп (19-30 лет и старше 61 года) и более высокие для других (31-60 лет). Впрочем, выявленные отличия могли быть связаны с ограниченным объемом (31-43 человека) ранжированных по возрастам выборок. Отметим, что исследовательские группы в Дании и Швеции также выявляли снижение уровней TREC с возрастом. [15, 26]. Выявленное снижение уровней KREC с возрастом может быть связано с особенностью обследуемой популяции, но также возможно, что на полученные результаты оказал влияние ограниченный объем выборок и возрастное ранжирование взрослых доноров

на две группы: 15-35 лет и старше 35 лет. В то же время мы не можем отрицать вероятности, что отсутствие в полученных нами результатах свидетельства о снижении уровня KREC с возрастом может быть связано с особенностью обследуемой популяции, ограниченного объема анализируемых выборок и возрастным ранжированием.

В нашей работе не было выявлено достоверных различий в уровнях TREC и KREC между мужчинами и женщинами как в рамках возрастных категорий, так и независимо от возраста, хотя ранее сообщалось о более высоком уровне TREC у девочек-подростков и о замедленном снижении уровня TREC с возрастом у взрослых женщин по сравнению с мужчинами [21, 24]. Однако другие исследователи сообщают об отсутствии разницы уровней TREC и KREC в зависимости от пола [11] или о некоторой тенденции к более высоким уровням TREC у девочек по сравнению с мальчиками в возрасте до одного года, но отсутствию различий в старшем возрасте [34].

По всей видимости, популяционные различия и отличающиеся объемы исследуемых выборок могут быть причиной расхождений результатов.

Особого внимания заслуживает рекомендация международных сообществ непрерывно продолжать сбор материала от условно здоровых лиц и анализ результатов с последующим регулярным пересмотром и обновлением референсных интер-

валов. Так, для новорожденных в странах Европы при скрининге с использованием набора "EnLite Neonatal TREC" (Perkin Elmer, Турку, Финляндия) в настоящее время установлено более высокое пороговое значение TREC для повторного тестирования: первоначальное пороговое значение для повторного тестирования составляло 34 копии/мкл (3-й перцентиль), которое было изменено на 24 копии/мкл (1-й перцентиль) в 2018 г., так как большинство детей с начальными значениями TREC от 34 до 25 копий/мкл были здоровы [6].

Заключение

Проведенный анализ позволил установить невозможность определения единого РИ концентраций молекул TREC в периферической крови взрослых представителей популяции (старше 18 лет). Нижняя и верхняя границы референтных значений данного анализа были определены для каждой выделенной возрастной группы. В то же время определение РИ концентраций молекул KREC для каждой возрастной группы является нецелесообразным, поскольку отсутствует корреляция концентрации данных фрагментов ДНК с возрастом представителей популяции. Для данного параметра определен единый РИ для взрослого населения в целом.

Список литературы / References

1. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. Введ. 2010-01-01. М.: Стандарт информ, 2009. 19 с. [GOST R 53022.3-2008. Clinical laboratory technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory research. Part 3. Rules for assessing the clinical informativeness of laboratory tests. Introduction 2010-01-01]. Moscow: Standart inform, 2009. 19 p.
2. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов // Лабораторная служба, 2019. Т. 8, № 2. С. 36-44. [Evgina S.A., Saveliev L.I. Current theory and practice of reference interval. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service*, 2019, Vol. 8, no. 2, pp. 36-44. (In Russ.)]
3. Клинические рекомендации. Первичные иммунодефициты преимущественно с недостаточностью антител (D80- D 80.9; D83 – D83.2; D83.8; D83.9). 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://nrcii.ru/specialistam/klinrecommend/pid.pdf>. [Clinical guidelines. Primary immunodeficiencies predominantly with antibody deficiency (D80- D 80.9; D83 – D83.2; D83.8; D83.9). 2018. [Electronic resource]. Access mode: <https://nrcii.ru/specialistam/klinrecommend/pid.pdf>.
4. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет, 2022, Т. 12, № 5. С. 981-996. [Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian Areg A. Modified method for quantitative determination of TREC and KREC levels in peripheral blood in patients with immunodeficiency states. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 5, pp. 981-996. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.
5. Тузанкина И.А., Каракина М.Л., Власова Е.В. Анализ клинических проявлений дебюта первичных иммунодефицитов у взрослых // Медицинская иммунология, 2014. Т. 4, № 16. С. 367-374. [Tuzankina I.A., Karakina M.L., Vlasova E.V. Analysis of the clinical manifestations of the onset of primary immunodeficiencies in adults. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 4, no. 16, pp. 367-374. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-367-374.
6. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. С. 251-260. [Yarilin A.A. *Immunology*]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, pp. 251-260.

7. Argudo-Ramírez A., Martín-Nalda A., Marín-Soria J.L., López-Galera R.M., Pajares-García S., González de Aledo-Castillo J.M., Martínez-Gallo M., García-Prat M., Colobran R., Riviere J.G., Quintero Y., Collado T., García-Villoria J., Ribes A., Soler-Palacín P. First Universal Newborn Screening Program for Severe Combined Immunodeficiency in Europe. Two-Years' Experience in Catalonia (Spain). *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2406. doi:10.3389/fimmu.2019.02406.
8. Brown J.J., Datta V., Browning M.J., Swift P.G.F. Graves' disease in DiGeorge syndrome: patient report with a review of endocrine autoimmunity associated with 22q11.2 deletion. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 2004, Vol. 17, pp. 1575-1579.
9. CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline. Third edition. Wayne, Pa. USA: CLSI. 2010. Available at: https://clsi.org/media/1421/ep28a3c_sample.pdf.
10. Dar N., Gothelf D., Korn D., Frisch A., Weizman A., Michaelovsky E., Carmel M., Yeshayahu Y., Dubnov-Raz G., Pessach I.M., Simon A.J., Lev A., Somech R. Thymic and bone marrow output in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *Pediatr. Res.*, 2015, Vol. 4, no. 7, pp. 579-585.
11. di Renzo M., Pasqui A.L., Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin. Exp. Med.*, 2004, Vol. 3, no. 4, pp. 211-217.
12. García-Prat M., Álvarez-Sierra D., Aguiló-Cucurull A., Salgado-Perandrés S., Briongos-Sebastian S., Franco-Jarava C., Martín-Nalda A., Colobran R., Montserrat I., Hernández-González M., Pujol-Borrell R., Soler-Palacín P., Martínez-Gallo M. Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2019, Vol. 96, no. 3, pp. 223-233.
13. Gathmann B. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 167, no. 3, pp. 479-491.
14. Hazenberg M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med.*, 2001, Vol. 79, no. 11, pp. 631-640.
15. Jung D., Alt F.W. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell*, 2004, Vol. 116, no. 2, pp. 299-311.
16. Just H.L., Deleuran M., Vestergaard C., Deleuran B., Thestrup-Pedersen K. T-cell receptor excision circles (TREC) in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations in atopic dermatitis and psoriasis show major differences in the emission of recent thymic emigrants. *Acta Derm. Venereol.*, 2008, Vol. 88, no. 6, pp. 566-572.
17. Kamae C., Nakagawa N., Sato H., Honma K., Mitsui N., Ohara O., Kanegane H., Pasic S., Pan-Hammarström Q., van Zelm M.C., Morio T., Imai K., Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, no. 5, pp. 1437-1440.
18. Kwok J.S.Y., Cheung S.K.F., Ho J.C.Y., Tang I.W.H., Chu P.W.K., Leung E.Y.S. Establishing simultaneous T Cell Receptor Excision Circles (TREC) and K-Deleting Recombination Excision Circles (KREC) quantification assays and laboratory reference intervals in healthy individuals of different age groups in Hong Kong. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1411. doi: 10.3389/fimmu.2020.01411.
19. Lucas M., Lee M., Lortan J., Lopez-Granados E., Misbah S., Chapel H. J. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 6, pp. 1354-1360.
20. Naylor K., Li G., Vallejo A.N., Lee W.W., Koetz K., Bryl E. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 11, pp. 7446-7452.
21. Peyvandi S., Lupo P.J., Garbarini J. 22q11.2 deletion in patients with conotruncal defects: data from 1610 consecutive cases. *Pediatr. Cardiol.*, 2013, Vol. 34, no. 7, pp. 1687-1694.
22. Pido-Lopez J., Imami N., Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, Vol. 125, no. 3, pp. 409-413.
23. Quinti I., Soresina A., Spadaro G., Martino S., Donnanno S., Agostini C. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 27, no. 3, pp. 308-316.
24. Siest G., Henny J., Grasbeck R., Wilding P., Petitclerc C., Queraltó J., Petersen P. The theory of reference values: an unfinished symphony. *CCLM*, 2013, Vol. 51, no. 1, pp. 47-64.
25. Sottini A., Serana F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessoro M., Lmberti L. Simultaneous quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs) and K-deleting recombination excision circles (KRECs) by real-time PCR. *J. Vis. Exp.*, 2014, Vol. 94, 52184. doi: 10.3791/52184.
26. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 1, pp. 24-64.
27. Törlén J., Gaballa A., Remberger M., Mörk L.M., Sundberg B., Mattsson J., Uhlin M. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis regimens on T and B cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 6, pp. 1260-1268.
28. Tuano K.S., Seth N., Chinen J. Secondary immunodeficiencies: An overview. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2021, Vol. 127, no. 6, pp. 617-626.

29. Urm S.H. Asthma and risk of selective IgA deficiency or common variable immunodeficiency: a population based case control study. *Mayo Clin. Proc.*, 2013, Vol. 88, no. 8, pp. 813-821.
30. Vadamalai K. Screening for humoral immunodeficiency in patients with community-acquired pneumonia. *J. Hosp. Med.*, 2019, Vol. 14, no. 1, pp. 33-37.
31. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. PID comes full circle: applications of V(D) J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front Immunol.*, 2011, Vol. 2, 12. doi: 10.3389/fimmu.2011.00012.
32. Verbsky J.W. Newborn screening for severe combined immunodeficiency; The wisconsin experience (2008-2011). *J. Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 32, no. 1, pp. 82-88.
33. Verma N. Therapeutic management of primary immunodeficiency in older patients. *Drugs Aging*, 2013, Vol. 30, no. 7, pp. 503-512.
34. Verstegen R.H.J. Impact of Down syndrome on the performance of neonatal screening assays for severe primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 4, pp. 1208-1211.
35. Zhao Q., Dai R., Li Y., Wang Y., Chen X., Shu Z., Zhou L., Ding Y., Tang X., Zhao X. Trends in TREC values according to age and gender in Chinese children and their clinical applications. *Eur. J. Pediatr.*, 2022, Vol. 181, no. 2, pp. 529-538.

Авторы:

Сайтгалина М.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Любимова Н.Е. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Останкова Ю.В. — к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Кузнецова Р.Н. — к.м.н., врач-иммунолог ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотолян Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Saitgalina M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Liubimova N.E., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Clinical Immunologist, Saint Petersburg Pasteur Institute; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

ВЛИЯНИЕ АЭРОТОКСИКАНТОВ НА ВЫБРОС ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ОБСТРУКТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

Ищенко О.В.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск,
Республика Беларусь*

Резюме. Хронический воспалительный процесс при обструктивных заболеваниях легких, развивается у генетически предрасположенных лиц при длительном или массивном воздействии аллергенов или аэротоксикантов. В результате такого действия происходит гиперактивация системы иммунитета и, как следствие, неконтролируемый воспалительный ответ. Целью исследования было определение уровня цитокинов в надосадочной жидкости после инкубации лейкоцитов пациентов с ХОБЛ и бронхиальной астмой с аэротоксикантами: раствором сигаретного дыма, водного экстракта табака сигарет и раствора выхлопных газов двигателя внутреннего сгорания. Цитокины определяли методом ИФА в надосадочной жидкости после инкубации лейкоцитов периферической венозной крови с аэротоксикантами. Для исследования, через двое суток после окончания инфузионной терапии глюкокортикоидными, периферическую венозную кровь 10 мл пациентов забирали в пробирку с гепарином. После отстаивания крови, удаляли плазму с лейкоцитами, центрифугировали 1500 об/мин. Осадок лейкоцитов разводили стерильным физиологическим раствором до консистенции 2 млн клеток на 1 мл раствора. Один образец лейкосуспензии каждого пациента разделяли на 4 лунки планшета по 100 мкл. В три лунки добавляли равный объем модельных растворов, имитирующих действие токсикантов. В четвертую – стерильный физиологический раствор хлорида натрия (спонтанная реакция). Смесь выдерживали при 37 °С 45 мин. Центрифугировали на планшетной центрифуге в течение 10 мин. Для ИФА анализа из каждой лунки планшета 50 мкл надосадочной жидкости переносили в лунку другого планшета и маркировали тем же номером. В результате исследования было обнаружено, что растворы сигаретного дыма и выхлопных газов вызывали выброс IL-1 β лейкоцитами у больных бронхиальной астмой и ХОБЛ, но не в контрольной группе здоровых лиц. Наблюдала спонтанное увеличение уровня IL-1 β у пациентов с бронхиальной астмой. Раствор экстракта сигарет вызывал повышение уровня TNF α в надосадочной жидкости у больных ХОБЛ. При воздействии раствором выхлопных газов выявлено повышение уровня TGF- β у больных бронхиальной астмой по сравнению со спонтанной активацией ($p < 0,05$), а также повышение уровня IFN γ у больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Не выявлено статистически значимых изменений уровней IL-6, IL-2, IL-4, IL-12, IFN α при воздействии аэротоксикантов на лейкоциты больных ХОБЛ, бронхиальной астмой и здоровых лиц.

Ключевые слова: цитокины, аэротоксиканты, ХОБЛ, бронхиальная астма

Адрес для переписки:

*Ищенко Оксана Владимировна
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»
210009, Республика Беларусь, г. Витебск,
пр. Фрунзе, 112, корп. 4, кв. 19.
Тел.: +375 (336) 75-49-08.
E-mail: oksana_is20027@mail.ru*

Address for correspondence:

*Aksana U. Ishchanka
Vitebsk State Medical University
210009, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze ave., 112,
bldg 4, apt 19.
Phone: +375 (336) 75-49-08.
E-mail: oksana_is20027@mail.ru*

Образец цитирования:

*О.В. Ищенко «Влияние аэротоксикантов на выброс цитокинов лейкоцитами при хронических обструктивных заболеваниях легких» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1237-1248.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2390*

© Ищенко О.В., 2022

*Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

A.U. Ishchanka "Effect of toxic air pollutants on the cytokine release by leukocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1237-1248. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2390

© Ishchanka A.U., 2022

*The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License*

DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2390

EFFECT OF TOXIC AIR POLLUTANTS ON THE CYTOKINE RELEASE BY LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Ishchanka A.U.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. Chronic inflammation in obstructive pulmonary disease develops in genetically predisposed individuals with prolonged or massive exposure to allergens or toxic air pollutants. This effect leads to hyperactivation of immune system and development of uncontrolled inflammatory response. The aim of the study was to determine the level of cytokines in the supernatant of leukocytes from the patients with COPD and asthma following incubation with air toxicants, i.e., a solution of cigarette smoke, an extract of cigarette tobacco, or a solution of exhaust combustion gases. The cytokines were determined by ELISA in the supernatants following exposure of peripheral venous blood leukocytes to the toxicants. To perform the assays, 10-mL samples of peripheral venous blood from the patients were taken into the test tubes with heparin (20 U/mL) in the morning time, not earlier than 2 days after therapeutic infusions of glucocorticosteroids. After gravity sedimentation, the leukocyte-rich was removed, centrifuged at 1500 rpm, then the liquid was discarded, and the leukocyte pellets were diluted with buffered saline ($2 \cdot 10^6$ cells/mL). Individual leukocyte suspensions were divided into 4 wells of an immunological plate, 100 μ L each. Equal volumes of test solutions simulating the effect of toxicants were added to three wells. The fourth well contained sterile isotonic sodium chloride solution (negative control). The mixtures in plates were exposed for 45 min at 37 °C followed by centrifugation for 10 min at 1500 rpm. From each well, 50 μ L of the supernatant was taken and transferred to the plate for ELISA assays (under the same number). As a result, we have found that the solutions of cigarette smoke and exhaust gases caused release of IL-1 β by leukocytes in the patients with asthma and COPD, but not in the samples from control group of healthy volunteers. Spontaneous increase in the IL-1 β level was registered in the patients with asthma. The cigarette extracts caused an increased release of TNF α in the supernatant fluid of the patients with COPD. Upon exposure to a solution of exhaust gases, an increased level of TGF- β was revealed in patients with asthma compared to spontaneous cell activation ($p < 0.05$), as well as an increase in IFN γ contents in the patients with COPD as compared with control group ($p < 0.05$). No statistically significant changes were revealed for the levels of IL-6, IL-2, IL-4, IL-12, IFN α upon exposure of air toxicants on the leukocytes of patients with COPD, asthma or healthy volunteers.

Keywords: cytokines, air toxicants, chronic obstructive pulmonary disease, asthma

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и бронхиальная астма (БА) являются высокой медицинской и социально-экономической проблемой. Хронический воспалительный процесс при обструктивных заболеваниях легких: ХОБЛ и БА, развивается у генетически предрасположенных лиц при длительном или массивном воздействии аллергенов или аэротоксикантов [24, 25, 26]. В результате такого действия происходит гиперактивация системы иммунитета и, как следствие, неконтролируемый воспалительный ответ.

Аэротоксиканты включают в себя сигаретный дым, выбросы в атмосферный воздух выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания, промышленные выбросы, загрязнение воздуха бытовыми источниками (печи, дизельные, угольные и газовые отопительные системы и др.). Действуя на эпителий слизистой бронхиального дерева и клетки врожденного иммунитета через Toll-

рецепторы, они приводят к выделению провоспалительных цитокинов [10].

В настоящее время курение сигарет является самым распространенным фактором риска ХОБЛ. У курильщиков наблюдается повышенная распространенность респираторных симптомов и расстройств легочной функции, повышенная смертность от ХОБЛ по сравнению с некурящими. Курильщики трубок и сигар, страдающие ХОБЛ, умирают чаще, чем некурящие, хотя по показателям заболеваемости и смертности они отстают от курильщиков сигарет [34]. Возраст, в котором начато курение, общее количество пачек/лет и текущий статус курения являются прогностическими показателями для смертности от ХОБЛ. Появлению первых клинических симптомов у больных ХОБЛ обычно предшествует длительное курение – 20 и более лет.

Систематический анализ и метаанализ исследований, проведенных в 28 странах с 1990 по

2004 г. [26], и данные дополнительного исследования в Японии [22] показали, что распространенность ХОБЛ как у настоящих курильщиков, так и у бывших курильщиков встречается гораздо чаще, чем у некурящих, больше у мужчин старше 40 лет. Пассивное курение также может вносить свой вклад в развитие респираторных симптомов и ХОБЛ [4, 31, 34].

Курение может приводить не только к снижению функции легких, бронхиальной гиперреактивности, развитию фиброза и эмфиземы, а также к изменениям реологических свойств крови, возникновению сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, заболеваний периферических сосудов и развитию опухолей.

Горящая сигарета продуцирует более 4 тысяч различных веществ. Из них более 40 являются канцерогенными. В дыме одной сигареты содержится примерно 70 мг твердых частиц и 23 мг угарного газа. В обработанных фабричным способом листьях табака содержится: никотина – до 6%, углеводов – до 30%, органических кислот – до 17%, эфирных масел – до 2%, белковых соединений – до 13% [9, 38].

Основной мишенью непосредственного воздействия дыма табака сигарет является бронхолегочная система, а именно непосредственное повреждение респираторного эпителия с нарушением функции мукоцилиарного аппарата. Что способствует микробной колонизации слизистой оболочки бронхального дерева. Продукты жизнедеятельности бактерий усиливают их адгезию к эпителиальной клетке [20]. Флора носоглотки курильщиков содержит больше потенциальных патогенов, чем у некурящих, и меньше представителей нормальной микрофлоры (α -гемолитический и негемолитический стрептококк, *Prevotella* и *Peptostreptococcus species*) [16].

Имеется достаточно много сообщений о наличии нарушений в системе иммунитета на фоне курения. Так, в сравнении с некурящими у курильщиков снижена концентрация сывороточного IgG [27]. Кроме того, у курящих снижается Т-клеточный пролиферативный ответ на митогенные стимулы [18, 40], что, в свою очередь, снижает активность Th2-лимфоцитов, необходимых для пролиферации В-лимфоцитов и дифференциации их в плазматические клетки, синтезирующие иммуноглобулины.

Продемонстрировано синтез антиген – анти тело комплексов в ответ на присутствие в табачном дыме различных субстанций, выступающих в роли антигена. Образовавшиеся комплексы могут вызывать соответствующие нарушения в гуморальном и клеточном иммунных ответах, а также нарушения в системе местной защиты легких, что предрасполагает к развитию бронхолегочных инфекций [29].

Под влиянием курения снижается фагоцитарная активность клеток (поглощение и микробный киллинг) со стороны как альвеолярных макрофагов, так и нейтрофилов [35, 44].

В глобальном масштабе курят 47% мужчин и 42% женщин [23]. В Республике Беларусь курят 25,1% (2014 г.) населения – 48% мужчин старше 16 лет и 8,9% женщин [5]. В Российской Федерации курят 60,2% мужчин и 21,7% женщин, Россия является самой курящей страной в мире. В США – 24% мужчин, 16,2% женщин [23].

Вклад автотранспорта в экологическое загрязнение воздуха мегаполисов составляет около 60-90% [11]. Выхлопные газы представляют собой неоднородную смесь около 300 веществ газообразных веществ и твердых частиц (азот, углекислый газ, угарный газ, оксид азота, альдегиды, углеводороды, безопорен и т. д.). Большинство компонентов выхлопных газов являются токсичными [11]. Твердые частицы выхлопных газов содержат токсичные металлы Pb, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn [2].

Выхлопные газы, наряду с канцерогенным и токсическим воздействием, могут индуцировать аллергические реакции [1, 8].

Для ХОБЛ и БА характерны изменения не только бронхолегочного аппарата, но и системные иммуноопосредованные патологические изменения. Так, в системном кровотоке у пациентов с БА определяют повышенный уровень IgE, IL-17, IL-4, IL-5 и др. При ХОБЛ – повышенный уровень IL-1, IL-6, IL-8 и др. Представляется интересным изучение влияния аэротоксикантов на продукцию различных цитокинов лейкоцитами системного кровотока при ХОБЛ и БА.

Целью исследования было определение уровня цитокинов в надосадочной жидкости после инкубации лейкоцитов пациентов с ХОБЛ и БА с аэротоксикантами (раствором сигаретного дыма (РД), водного экстракта табака сигарет (ЭТ) и раствора выхлопных газов дизельного двигателя внутреннего сгорания (ВГ)).

Материалы и методы

Контингент пациентов

В исследование включали пациентов с obstructивными заболеваниями: с ХОБЛ (n = 10) с частыми обострениями, группа D, среднетяжелого течения ($50\% \leq FEV_1 < 80\%$), а также тяжелого течения ($30\% \leq FEV_1 < 50\%$). GOLD [26]; с аллергической БА (n = 10) средней степени тяжести. Контрольную группу составили здоровые лица без obstructивной патологии (n = 10). Все участники исследования были ограничены по возрасту – старше 35 лет.

Исследуемая когорта пациентов представляет собой субпопуляцию, выбранную случайным об-

разом из группы пациентов исследования гиперчувствительности нейтрофилов при обструктивных заболеваниях легких 2011–2018 гг. [6, 13, 14]. Пациенты ХОБЛ и БА находились на лечении в учреждении здравоохранения «Витебская областная клиническая больница» (ВОКБ) и были включены в исследование после получения исследователем информированного согласия. Работа одобрена этическим комитетом ВОКБ.

Диагноз «ХОБЛ» устанавливали при наличии у пациентов следующих признаков GOLD:

наличие одышки: прогрессирующей (ухудшающейся со временем), усиливающейся при физической нагрузке, персистирующей;

хронического эпизодического или постоянного кашля с отхождением мокроты или непродуктивного;

воздействие факторов риска в анамнезе: курение табака, дым от кухни и отопления; профессиональные пылевые поллютанты и химикаты;

наличие семейного анамнеза ХОБЛ;

наличие постбронходилатационного значения FEV_1 / форсированной жизненной емкости легких (FVC) < 70%;

исключение других болезней.

Постановку диагноза «БА» проводили на основании жалоб пациента, аллергоанамнеза, общеклинических исследований, результатов аллергологического и лабораторного тестирования, бронхомоторных тестов (GINA).

Методика приготовления модельных растворов, имитирующих действие аэротоксикантов

Приготовление экстракта табака сигарет проводили по модифицированной нами методике Petro T.M. и соавт. [6, 36]. Перед постановкой теста раствор разводили стерильным физиологическим фосфатным буферным раствором 1:100. Концентрация никотина составила $0,3 \pm 0,05$ мг/мл. Для приготовления раствора сигаретного дыма использовали методику Hodge S. и соавт. [30] с небольшими изменениями [6]. Для постановки проб готовый раствор разводили стерильным фосфатным буферным раствором для получения оптимальной рабочей концентрации 1:100 (0,01 ед/мл). Эта концентрация приблизительно эквивалентна курению 1 сигареты [30]. Для приготовления раствора выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания использовали метод, предложенный Голохвастом К.С. и соавт. [3, 6, 13]. Средняя концентрация растворенных нефтепродуктов в препарате составила $3,47 \pm 0,5$ мг/л. Перед постановкой теста раствор разводили 1:100 фосфатным буферным раствором.

Изоляция лейкоцитов

Для исследования через двое суток после окончания инфузионной терапии глюкокортикоидными препаратами периферическую венозную кровь

пациентов забирали в пробирку с гепарином (10 мл). После отстаивания крови удаляли плазму с лейкоцитами, центрифугировали (1500 об/мин). Осадок лейкоцитов разводили стерильным физиологическим раствором до консистенции 2 млн клеток на 1 мл раствора.

Воздействие модельных растворов, имитирующих действие аэротоксикантов, на лейкоциты

У один образец лейкосуспензии каждого пациента разделяли на 4 лунки планшета по 100 мкл. В три лунки добавляли равный объем модельных растворов, имитирующих действие токсикантов – РД, ЭТ, ВГ. В четвертую – стерильный физиологический раствор хлорида натрия (спонтанная реакция). Смесь выдерживали при 37 °С 45 мин. Центрифугировали на планшетной центрифуге в течение 10 мин. Для ИФА анализа из каждой лунки планшета 50 мкл надосадочной жидкости переносили в лунку другого планшета и маркировали тем же номером.

Измерение цитокинов в надосадочной жидкости

Уровень цитокинов определяли на иммуноферментном анализаторе Ф-300 «Витязь» (Республика Беларусь), предназначенного для выполнения иммуноферментного анализа в планшетном формате (спектральный диапазон 340–620 нм), используя следующие наборы (табл. 1).

Статистический анализ результатов проведен с использованием компьютерных программ Statistica 10.0, Microsoft Office Excel 2020. Использовали непараметрические методы анализа. Результаты показателей представлены в виде медианы и величины интерквартильного размаха ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$ %). При сравнении несвязанных групп использовали критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса (3 и более). При сравнении связанных групп применяли дисперсионный анализ по Фридмену (3 и более связанных групп). Проводили попарное сравнение методом Ньюмена–Кейлса. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Клиническо-демографическая характеристика участников исследования представлена в таблице 2. Наблюдала различия в группах. В группе ХОБЛ было больше мужчин-курильщиков с низким индексом массы тела и худшими спирографическими показателями. В то же время группы были однородны по возрасту, длительности болезни и числу обострений.

Влияние воздействия модельных растворов аэротоксикантов на выброс цитокинов лейкоцитами

Уровень цитокинов в надосадочной жидкости представлен в таблице 3.

ТАБЛИЦА 1. НАБОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ

TABLE 1. PRODUCTS FOR THE DETERMINATION OF CYTOKINES BY ENZYME IMMUNOASSAY

Цитокины Cytokines	Производитель Manufacturer	Каталожный номер наборов ИФА CAS Number
IL-1 β	ООО «Цитокин», Россия LLC Cytokin, Russia	ИФА-IL1- β ELISA-IL1- β
IL-2	АО «Вектор-Бест», Россия JSC Vector-Best, Russia	8772
IL-4	АО «Вектор-Бест», Россия JSC Vector-Best, Russia	8754
IL-6	АО «Вектор-Бест», Россия JSC Vector-Best, Russia	8768
IL-12	Thermo SCIENTIFIC, США Thermo SCIENTIFIC, USA	Human IL-12 (p70) ELISA Kit Cat.№ EHIL12
TGF- β 1	DRG Diagnostics, США DRG Diagnostics, USA	TGF- β 1 ELISA Cat. №EIA-1864
TNF α	ООО «Цитокин», Россия LLC Cytokin, Russia	ИФА-TNF α
IFN α	ООО «Цитокин», Россия LLC Cytokin, Russia	ИФА-IFN α
IFN γ	АО «Вектор-Бест», Россия JSC Vector-Best, Russia	A-8752

ТАБЛИЦА 2. КЛИНИЧЕСКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Variable	ХОБЛ COPD n = 10	БА Asthma n = 10	Группа контроля Control group n = 10
Возраст, годы Age, years	54 (45-69)	49 (39-61)	47 (35-57)
Пол, м/ж Sex, m/f	9/1*	6/4	3/7
Длительность заболевания, годы Duration of the disease, years	17 (8-19)	14 (6-28)	0
Индекс курения, пачка-лет (пачка-день \times стаж курения в годах) Smoking index, pack-years (pack-day \times smoking experience in years)	22 (10-39)*	11 (0-28)	9 (0-15)*
Текущий статус курения, да/нет Current smoking status, yes/no	9/1*	3/7	3/7
Число обострений за последний год Number of exacerbations in the last year	3 (2-4)	3 (2-3)	0
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	24,5 (21,0-25,1)*	26 (24,7-28,0)	27 (26,9-28,0)
FEV ₁ , %**	69 (64-73)*	89 (72-96)	92 (90-108)
Постбронходилатационный FEV ₁ / FVC*** % Postbronchodilatory FEV ₁ / FVC %	56 (51-65)	79 (77-88)	85 (89-105)

Примечание. * p < 0,05; ** FEV₁ – объем форсированного выдоха за первую секунду; *** FVC – форсированная жизненная емкость.

Note. * p < 0,05; ** FEV₁, forced expiratory volume in the first second; *** FVC, forced vital capacity.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ АЭРОТОКСИКАНТОВ НА ВЫБРОС ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. INFLUENCE OF MODEL SOLUTIONS OF AIR TOXICANTS ON THE RELEASE OF CYTOKINES BY LEUKOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Variable	Группы Groups			p				
	1	2	3	p _{к-у}	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃	
	ХОБЛ COPD n = 10	БА Asthma n = 10	Группа контроля Control n = 10					
Провоспалительные цитокины (пг/мл) Proinflammatory cytokines (pg/mL)								
TNF α	РД SS	6,9 (0,0-1,9)	1,1 (0-0)	4,9 (0,0-0,5)	0,817	–	–	–
	ЭТ ET	22,6 (0,0-44,0)*	0,9 (0,0-1,7)	0,6 (0-0)	0,047	0,005	0,011	0,952
	ВГ EG	16,4 (0,0-22,0)*	17,7 (0,0-44,0)*	4,9 (0,0-1,0)	0,177	–	–	–
	СП SP	0 (0-0)	0 (0-0)	0,6 (0-0)	0,126	–	–	–
IL-1 β	РД SS	17,0 (0,0-23,0)	33,1 (15,0-45,0)	7,0 (0,0-27,3)*	0,028	0,141	0,355	0,05
	ЭТ ET	21,7 (0,0-33,0)	15,8 (4,0-21,0)	10,0 (0,0-12,4)	0,631	–	–	–
	ВГ EG	37,6 (0,0-55,0)	87,1 (44,0-104,0)*	68,8 (0,0-23,9)*	0,018	0,057	0,007	0,052
	СП SP	5,5 (0,0-4,0)	11,8 (1,0-21,0)	1,6 (0,0-1,0)	0,05	0,164	0,383	0,070
IL-6	РД SS	1,4 (0,0-2,9)	3,7 (0,0-4,1)	1,4 (0,0-2,7)	0,953	–	–	–
	ЭТ ET	1,3 (0,0-4,7)	4,9 (0,0-5,6)	1,6 (0,0-3,2)	0,529	–	–	–
	ВГ EG	1,8 (0,0-3,0)	10 (0,0-6,2)	1,9 (0,0-3,6)	0,915	–	–	–
	СП SP	1,8 (0,0-2,7)	3,6 (0,0-4,1)	1,4 (0,0-2,4)	0,809	–	–	–
T-регуляторные цитокины (пг/мл) T regulatory cytokines (pg/mL)								
IL-2	РД SS	1,4 (0,0-4,0)	0,6 (0,0-1,0)	0,8 (0,0-1,1)	0,865	–	–	–
	ЭТ ET	1,1 (0-0)	0,9 (0,0-1,0)	0,6 (0,0-1,0)	0,812	–	–	–
	ВГ EG	0,8 (0-0)	0,8 (0,0-1,0)	0,5 (0,0-1,2)	0,825	–	–	–
	СП SP	1,1 (0,0-3,0)	0,5 (0,0-1,0)	0,3 (0,0-0,3)	0,877	–	–	–
IL-4	РД SS	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–
	ЭТ ET	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Показатель Variable		Группы Groups			p			
		1	2	3	p _{K-W}	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
		ХОБЛ COPD n = 10	БА Asthma n = 10	Группа контроля Control n = 10				
IL-4	ВГ EG	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–
	СП SP	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–
IL-12	РД SS	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–
	ЭТ ET	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–
	ВГ EG	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–
	СП SP	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,0	–	–	–
TGF-β	РД SS	38,3 (14,0-65,0)	22,3 (3,0-33,0)	38,5 (0,0-65,4)	0,741	–	–	–
	ЭТ ET	22,4 (6,0-32,0)	17,4 (3,0-22,0)	31,1 (0,0-43,2)	0,567	–	–	–
	ВГ EG	27,4 (6,0-66,0)	39,7 (3,5-86,2)*	24,3 (0,0-30,2)	0,763	–	–	–
	СП SP	17,2 (5,0-33,0)	12,8 (2,0-12,0)	6,2 (0,0-9,0)	0,549	–	–	–
Семейство интерферонов (пг/мл) Interferon family (pg/mL)								
IFNα	РД SS	6,8 (1,0-7,2)	2,8 (1,0-5,0)	5,7 (0,0-4,5)	0,757	–	–	–
	ЭТ ET	8,0 (3,6-12,0)	3,2 (1,6-5,0)	9,8 (0,0-12,3)	0,354	–	–	–
	ВГ EG	6,3 (1,4-7,2)	6,7 (0,0-4,0)	9,2 (0,0-14,9)	0,641	–	–	–
	СП SP	6,2 (1,4-12,0)	2,3 (0,0-4,0)	7,4 (2,0-11,3)	0,354	–	–	–
IFNγ	РД SS	4,0 (0,0-10,0)	1 (0,0-10,0)	2,4 (0,0-5,3)	0,684	–	–	–
	ЭТ ET	4,2 (0,0-10,0)	1 (0,0-10,0)	2,7 (0,0-5,0)	0,686	–	–	–
	ВГ EG	15,6 (0,0-47,8)*	9,4 (0-0)	5,1 (0,0-12,6)*	0,825	–	–	–
	СП SP	6,0 (0,0-6,0)	0,7 (0,0-6,0)	4,2 (0,0-9,9)	0,258	–	–	–

Примечание. РД – раствор сигаретного дыма, ЭТ – водный экстракт табака сигареты, ВГ – раствор выхлопных газов двигателя внутреннего сгорания, СП – спонтанная реакция (без аэротоксиканта), p_{K-W} – критерий Краскела–Уоллиса, при p_{K-W} < 0,05 попарное сравнение между группами методом Ньюмена–Кейлса, * – p < 0,05 в группах.

Note. SS, a solution of cigarette smoke; ET- an extract of cigarette tobacco; EG, a solution of exhaust gases from an internal combustion engine; SP, spontaneous reaction (without air toxicant); p_{K-W}, Kruskal–Wallis criterion; if p_{K-W} < 0.05, pairwise comparison between groups was used by the Newman–Keuls method; *, p < 0.05 in groups.

Модельные растворы выхлопных газов и сигаретного дыма вызывали выброс IL-1 β лейкоцитами у больных БА и ХОБЛ, но не в контрольной группе здоровых лиц (рис. 1). Причем раствор выхлопных газов в значительно большей степени, чем сигаретный дым ($p < 0,05$). Кроме того, наблюдали спонтанное увеличение уровня IL-1 β у пациентов с БА.

Раствор экстракта сигарет вызывал повышение в надосадочной жидкости уровня TNF α у больных ХОБЛ (рис. 1).

При воздействии раствором выхлопных газов выявлено повышение уровня TGF- β у больных БА по сравнению со спонтанной активацией ($p < 0,05$), а также повышение уровня IFN γ у больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Не выявлено статистически значимых изменений уровней IFN α , IL-6, IL-2, IL-4, IL-12, при воздействии аэротоксикантов на лейкоциты больных ХОБЛ, БА и здоровых лиц.

Обсуждение

В настоящее время известно, что провоспалительный цитокин IL-1 β повышается в дыхательных путях больных БА, обеспечивая местную воспалительную реакцию [37]. При ХОБЛ IL-1 β активизирует макрофаги легких, индуцирует секрецию других провоспалительных циткинов и хемокинов [12, 33].

В предыдущем исследовании нами было выявлено значительное повышение уровней IL-1 β и TGF- β системном кровотоке у больных ХОБЛ и БА, при этом уровни других цитокинов (TNF α ,

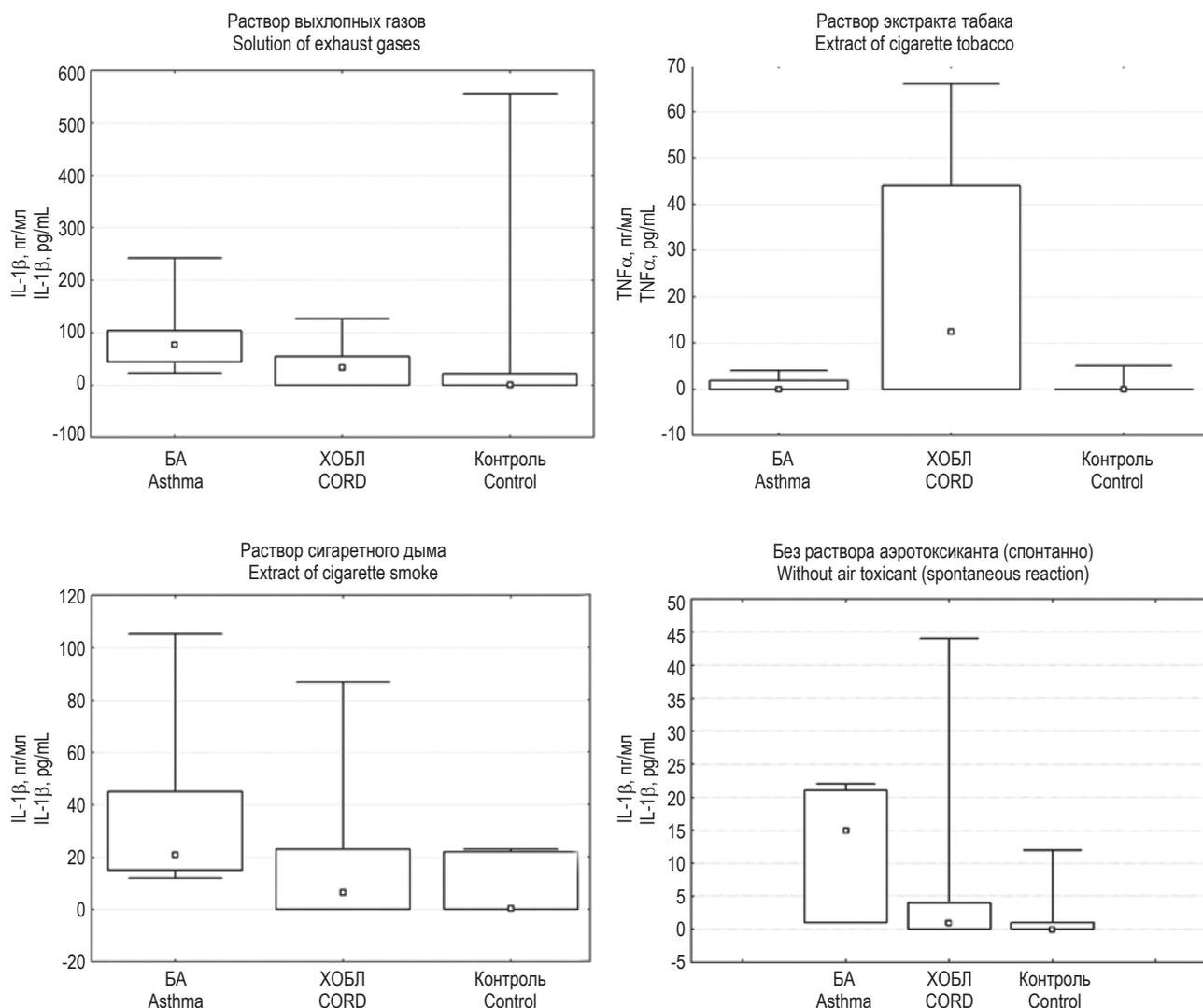


Рисунок 1. Динамика уровней цитокинов в надосадочной жидкости (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) Min-Max)

Figure 1. Dynamics of cytokine levels in the supernatant (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) Min-Max)

IL-6, IL-2, IL-4, IL-12, IFN α , IFN γ) в сыворотке крови у пациентов не отличались по группам и не превышали референтных значений [7].

Полученные результаты соотносятся с результатами нынешнего исследования. Индуцированный растворами выхлопных газов и сигаретного дыма IL-1 β увеличился как у больных ХОБЛ, так и БА. Кроме того, мы наблюдали выброс лейкоцитами TGF- β у больных БА при воздействии раствора сигаретного дыма. У больных БА отмечен спонтанный рост IL-1 β в надосадочной жидкости, чего не было при ХОБЛ и контрольной группе.

У больных с тяжелой БА бронхиальном дереве высоко экспрессирован TGF- β [15, 17]. Основной эффект TGF- β при обструктивных заболеваниях связывают с воздействием на фибробласты, при котором происходит повышенная продукция внеклеточных матричных белков, таких как коллаген и фибронектин, увеличение производства ингибиторов ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс, одновременно со снижением производства коллагеназы, что приводит к субэпителиальному фиброзу и ремоделированию бронхов.

Установлены иммунорегуляторные функции TGF- β [28, 39]. TGF- β супрессирует Т-хелперы первого и второго типа, воздействуя на Т-регуляторные клетки [19, 43].

Таким образом, воздействие выхлопных газов и сигаретного дыма могут не только индуцировать хроническое обструктивное заболевание, но и поддерживать системное воспаление у больных ХОБЛ и БА, и приводить к прогрессированию заболеваний.

Следующим интересным результатом, с нашей точки зрения, было отсутствие влияния раствор экстракта табака сигарет на провоспалительные IL-1 β и IL-6 во всех экспериментальных группах. Мы обнаружили, что раствор табака вызывает только выброс TNF α у больных ХОБЛ. Вероятно, это связано с действием никотина раствора табака на холинергические никотиновые рецепторы α 7-nAChR на лейкоцитах. Рецепторы α 7-nAChR

могут участвовать в модуляции секреции провоспалительных цитокинов и подавлении цитокинового шторма [32]. Никотин, как агонист α 7-nAChR рецептора, снижает продукцию цитокинов макрофагами и воспаления на животных моделях панкреатита и перитонита [41, 42]. Холинергический противовоспалительный путь в настоящее время активно изучается в связи с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Никотиновая терапия, возможно, может противодействовать блокирующему действию SARS-CoV-2 на nAChR и может быть предложена в качестве потенциального профилактического средства против инфекции COVID-19 [21].

И, наконец, мы не получили изменений уровней IFN α , IL-6, IL-2, IL-4, IL-12, в надосадочной жидкости при воздействии модельных растворов, имитирующих действие токсикантов. Вероятно, для изучения феноменов продукции этих цитокинов нужны другие лабораторные модели. Например, увеличение времени инкубации. Кроме того, основным ограничением нашего исследования является сравнительно небольшой размер выборки, поэтому результаты должны толковаться в некоторой степени осторожно. Однако, имея полученные результаты, можно планировать исследования большей мощности и новые направления исследований.

Выводы

1. Раствор выхлопных газов вызывает выброс лейкоцитами IL-1 β и IFN γ у больных ХОБЛ, а также — IL-1 β и TGF- β у больных БА.
2. Раствор сигаретного дыма вызывает выброс IL-1 β лейкоцитами у больных как БА, так и ХОБЛ, но в меньшей степени, чем раствор выхлопных газов.
3. Раствор экстракта сигарет вызывает у больных ХОБЛ выброс TNF α лейкоцитами.
4. Воздействие аэротоксикантов на лейкоциты больных ХОБЛ, БА и здоровых лиц не приводит к изменению уровней IL-6, IL-2, IL-4, IL-12, IFN α в надосадочной жидкости.

Список литературы / References

1. Галиев Р.С., Галиева С.А., Худобердиева Т.И. Особенности развития аллергической реакции в условиях воздействия выхлопных газов автотранспорта различной интенсивности // Экология человека, 2007. № 7. С. 20-23. [Galiev R.S., Galieva S.A., Khudoberdieva T.I. Peculiarities of hypersensitivity reaction development in environment of vehicles exhaust gases of different intensity. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2007, no. 7, pp. 20-23. (In Russ.)]
2. Голохваст К.С., Христофорова Н.К., Чернышев В.В., Никифоров П.А., Чайка В.В., Автомонов Е.Г., Романова Т.Ю., Карабцов А.А. Состав суспензии выхлопных газов автомобилей // Проблемы региональной экологии, 2013. № 6. С. 95-110. [Golokhvast K.S., Khristoforova N.K., Chernyshev V.V., Nikiforov P.A., Chayka V.V., Avtomonov E.G., Romanova T.Yu., Karabtsov A.A. Composition of suspension in exhaust gases of cars. *Problemy regionalnoy ekologii = Problems of Regional Ecology*, 2013, no. 6, pp. 95-110. (In Russ.)]

3. Голохваст К.С., Чернышев В.В., Никифоров П.А., Автомонов Е.Г., Паничев А.М., Гульков А.Н., Глушенко Д.А. Экологическое значение гранулометрического метода исследования взвесей в выхлопном газе легковых автомобилей // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2012. Т. 14, № 1 (9). С. 2405-2408. [Golokhvast K.S., Chernyshev V.V., Nikiforov P.A., Avtomonov E.G., Panichev A.M., Gulkov A.N., Glushenko D.A. Ecological significance of direct granulometric study suspended in car exhaust gas. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk = Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2012, Vol. 14, no. 1 (9), pp. 2405-2408. (In Russ.)]
4. Дворецкий Л.И. Курение и инфекция // Врач, 2013. № 2. С. 86-88. [Dvoretzky L.I. Smoking and infection. *Vrach = Doctor*, 2013, no. 2, pp. 86-88. (In Russ.)]
5. Здоровье населения Республики Беларусь 2009-2013. Статистический сборник / Национальный статистический комитет Республики Беларусь; редкол.: В.И. Зиновский, И.А. Костевич, И.С. Кангро, Е.И. Кухаревич, Е.М. Палковская, О.Н. Клавсуть, Р.Л. Врублевский. Минск, 2014. 218 с. [Health of the population of the Republic of Belarus 2009-2013. Statistical collection / National Statistical Committee of the Republic of Belarus; Editorial board: V.I. Zinovsky, I.A. Kostevich, I.S. Kangro, E.I. Kukharevich, E.M. Palkovskaya, O.N. Klavsut, R.L. Vrublevsky]. Minsk, 2014. 218 p.
6. Ищенко О.В., Сукало А.В. Гиперчувствительность нейтрофилов при обструктивных заболеваниях легких // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2017. № 3. С.79-89. [Ishchanka A.U., Sukalo A.V. Neutrophil hypersensitivity in chronic obstructive pulmonary disease. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2017, no. 3, pp. 79-89. (In Russ.)]
7. Ищенко О.В., Сукало А.В. Недостаточность системы иммунитета при хронической обструктивной болезни легких // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2018. № 1. С. 73-88. [Ishchanka A.U., Sukalo A.V. Immune system deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2018, no. 1, pp. 73-88. (In Russ.)]
8. Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Лаптева И.М. Эпидемиология хронической обструктивной болезни легких у городских жителей // Здоровоохранение, 2013. № 7. С. 21-25. [Kadushkin A.G., Taganovich A.D., Lapteva I.M. Urban resident chronic obstructive pulmonary disease epidemiology. *Zdravookhranenie = Healthcare*, 2013, no. 7, pp. 21-25. (In Russ.)]
9. Матвейко Н.П., Брайкова А.М., Садовский В.В. Содержание тяжелых металлов в дыме сигарет // Вестник Витебского технологического университета, 2014. № 27. С. 146-152. [Matveiko N.P., Braikova A.M., Sadovsky V.V. The content of heavy metals in cigarette smoke. *Vestnik Vitebskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Vitebsk Technological University*, 2014, no. 27, pp. 146-152. (In Russ.)]
10. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология. М.: Мед. лит., 2009. 464 с. [Novikov D.K., Novikov P.D. Clinical immunopathology]. Moscow: Med. lit., 2009. 464 p.
11. Охрана окружающей среды в Республике Беларусь 2011-2017. Статистический сборник / Национальный статистический комитет Республики Беларусь; редкол.: И.В. Медведева, И.С. Кангро, Ж.Н. Василевская, О.А. Довнар, Е.И. Кухаревич, Е.М. Палковская, Л.В. Чеканова, З.В. Якубовская. Минск, 2018. 228 с. [Environmental protection in the Republic of Belarus 2011-2017. Statistical collection / National Statistical Committee of the Republic of Belarus; Editorial board: I.V. Medvedeva, I.S. Kangro, J.N. Vasilevskaya, O.A. Dovnar, E.I. Kukharevich, E.M. Palkovskaya, L.V. Chekanova, Z.V. Yakubovskaya]. Minsk, 2018. 228 p.
12. Перцева Т.А., Санина Н.А. Выраженность системных воспалительных реакций у больных хронической обструктивной болезнью легких // Пульмонология, 2013. № 1. С. 38-41. [Pertseva T.A., Sanina N.A. The intensity of systemic inflammatory response in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2013, no. 1, pp. 38-41. (In Russ.)]
13. Смирнова О.В., Коневалова Н.Ю. Влияние выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания на выброс миелопероксидазы лейкоцитами у пациентов с хроническими обструктивными заболеваниями // Вестник ВГМУ, 2015. № 4. С. 64-71. [Smirnova O.V., Konevalova N.Y. The influence of exhaust gases of internal combustion engines on the myeloperoxidase release by leukocytes in patients with chronic obstructive diseases. *Vestnik VGMU = Bulletin of Vitebsk State Medical University*, 2015, no. 4, pp. 64-71. (In Russ.)]
14. Смирнова О.В. Оценка гиперчувствительности нейтрофилов к токсикантам при хронических обструктивных заболеваниях легких // Российский иммунологический журнал, 2015. Т.9 (18), № 3. С. 350-358. [Smirnova O.V. Assessment of neutrophils hypersensitivity to toxicants in chronic obstructive pulmonary diseases. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3, pp. 350-358. (In Russ.)]
15. Balzar S., Chu H.W., Silkoff P., Cundall M., Trudeau J.B., Strand M., Wenzel S. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 115, no. 1, pp. 110-117.
16. Brook I., Gober A.E. Effect of smoking cessation on the microbial flora. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2007, Vol. 133, no. 2, pp.135-138.
17. Chakir J., Shannon J., Molet S., Fukakusa M., Elias J., Laviolette M., Boulet L.P., Hamid Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003 Vol. 111, no. 6, pp. 1293-1308.
18. Chang J.C., Distler S.G., Kaplan A.M. Tobacco smoke suppresses T cells but not antigen-presenting cells in the lung-associated lymph nodes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1990, Vol. 1, no. 102, no. 3, pp. 514-523.

19. de Boer W.I., van Schadewijk A., Sont J.K., Sharma H.S., Stolk J., Hiemstra P.S., van Krieken J.H. Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998, Vol. 158, no. 6, pp. 1951-1957.
20. El Ahmer O.R., Essery S.D., Saadi A.T., Raza M.W., Ogilvie M.M., Weir D.M., Blackwell C.C. The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1999, Vol. 23, no. 1, pp. 27-36.
21. Farsalinos K., Angelopoulou A., Alexandris N., Poulas K. COVID-19 and the nicotinic cholinergic system. *Eur. Respir. J.*, 2020, Vol. 56, no. 1, 2001589. doi:10.1183/13993003.01589-2020.
22. Fukuchi Y., Nishimura M., Ichinose M., Adachi M., Nagai A., Kuriyama T., Takahashi K., Nishimura K., Ishioka S., Aizawa H., Zaher C. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*, 2004, Vol. 9, no. 4, pp. 458-465.
23. Giovino G.A., Mirza S.A., Samet J.M., Gupta P.C., Jarvis M.J., Bhalra N., Peto R., Zatonski W., Hsia J., Morton J., Palipudi K.M., Asma S.; GATS Collaborative Group. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet*, 2012, Vol. 380, no. 9842, pp. 668-679.
24. Global atlas of asthma. EAACI executive committee; Ed. Akdis C.A., Agache I. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2021. 356 p. Available at: <https://www.eaaci.org/newsfeed/newsfeed-bottom/4790-globalatlasofasthma>.
25. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, update 2021 (GINA). GINAasthma.org, 2021, 217 p. Available at: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2021/05/GINA-Main-Report-2021-V2-WMS.pdf>.
26. Global strategy for the diagnosis management, and prevention of chronic obstructive lung disease, update 2021 (GOLD). GOLD.org, 2021, 164 p. Available at: <https://goldcopd.org/2021-gold-reports/>.
27. Gonzalez-Quintela A., Alende R., Gude F., Campos J., Rey J., Meijide L.M., Fernandez-Merino C., Vidal C.. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, Vol. 151, no. 1, pp. 42-50.
28. Halwani R., Al-Muhsen S., Al-Jahdali H., Hamid Q. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2011, Vol. 44, no. 2, pp. 127-133.
29. Hersey P., Prendergast D., Edwards A. Effects of cigarette smoking on the immune system. Follow-up studies in normal subjects after cessation of smoking. *Med. J. Aust.*, 1983, Vol. 29, no. 2, no. 9, pp. 425-429.
30. Hodge S., Hodge G., Ahern J., Jersmann H., Holmes M., Reynolds P.N. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2007, Vol. 37, no. 6, pp. 748-755.
31. Jindal S.K., Aggarwal A.N., Chaudhry K., Chhabra S.K., D'Souza G.A., Gupta D., Katiyar S.K., Kumar R., Shah B., Vijayan V.K.; Asthma Epidemiology Study Group. A multicentric study on epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with tobacco smoking and environmental tobacco smoke exposure. *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.*, 2006, Vol. 48, no. 1, pp. 23-29.
32. Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M., Tzartos S.J. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J.*, 2007, Vol. 274, no. 15, pp. 3799-3845.
33. Matheson M.C., Benke G., Raven J., Sim M.R., Kromhout H., Vermeulen R., Johns D.P., Walters E.H., Abramson M.J. Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2005, Vol. 60, no. 8, pp. 645-651.
34. Office on Smoking and Health (US). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2006.
35. Palmer R.M., Wilson R.F., Hasan A.S., Scott D.A. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J. Clin. Periodontol.*, 2005, Vol. 32, Suppl. 6, pp. 180-195.
36. Petro T.M., Anderson L.L., Gowler J.S., Liu X.J., Schwartzbach S.D. Smokeless tobacco extract decreases IL-12 production from LPS-stimulated but increases IL-12 from IFN-gamma-stimulated macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, 2002, Vol. 2, no. 2-3, pp. 345-355.
37. Rosenwasser L.J. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998, Vol. 102, no. 3, pp. 344-350.
38. Sangani R.G., Ghio A.J. Lung injury after cigarette smoking is particle related. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2011, no. 6, pp. 191-198.
39. Takizawa H., Tanaka M., Takami K., Ohtoshi T., Ito K., Satoh M., Okada Y., Yamasawa F., Nakahara K., Umeda A. Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, Vol. 163, no. 6, pp. 1476-1483.
40. Thatcher T.H., Benson R.P., Phipps R.P., Sime P.J. High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2008, Vol. 295, no. 3, pp. L412-L421.
41. van Westerloo D.J., Giebelen I.A., Florquin S., Bruno M.J., Larosa G.J., Ulloa L., Tracey K.J., van der Poll T. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology*, 2006, Vol. 130, no. 6, pp. 1822-1830.

42. van Westerloo D.J., Giebelen I.A., Florquin S., Daalhuisen J., Bruno M.J., de Vos A.F., Tracey K.J., van der Poll T. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J. Infect. Dis.*, 2005, Vol. 191, no. 12, pp. 2138-2148.

43. Wan Y.Y., Flavell R.A. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2007, Vol. 4, no. 3, pp. 271-276.

44. Zappacosta B., Persichilli S., Minucci A., Stasio E.D., Carlino P., Pagliari G., Giardina B., Sole P.D. Effect of aqueous cigarette smoke extract on the chemiluminescence kinetics of polymorphonuclear leukocytes and on their glycolytic and phagocytic activity. *Luminescence*, 2001, Vol. 16, no. 5, pp. 315-319.

Автор:

Ищенко О.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Author:

Ishchanka A.U., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Поступила 27.07.2021
Принята к печати 04.01.2022

Received 27.07.2021
Accepted 04.01.2022

ВЛИЯНИЕ РЕАКТИВНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ

**Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С.,
Мамус М.А.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия*

Резюме. Результаты недавних исследований, демонстрирующих наличие провоспалительных медиаторов при остеоартрите (ОА), схожесть гистологических признаков воспаления при ревматоидном артрите (РА) и ОА, дают основание предположить важную роль нетоза (NETоза) в иммунном воспалении у больных ОА. Цель – оценить способность нейтрофилов периферической крови к спонтанному и индуцированному образованию NETs у больных ОА и влияние реактивного синовита на динамику показателей NETоза.

В исследование вошли 31 больной с верифицированным ОА и 30 условно здоровых лиц. Нейтрофилы выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола. Качественный состав нейтрофильной фракции оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, жизнеспособность клеток – методом исключения трипанового синего, степень активации – с помощью стандартного теста с нитросиним тетразолием. В качестве индуктора образования NETs применяли раствор форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА). Визуализировали спонтанное и индуцированное образование NETs с помощью флуоресцентной микроскопии.

На момент включения в исследование все больные ОА находились в стадии ремиссии. В процессе наблюдения у 23 больных отмечалось обострение ОА. Нейтрофильные фракции демонстрировали высокую чистоту и большое содержание жизнеспособных неактивированных клеток. Данные параметры были сопоставимыми в обеих группах. У больных ОА в ремиссии средняя доля нейтрофилов со спонтанным NETs существенно выше по сравнению со здоровыми лицами, применение ФМА-индуктора сопровождалось значительным повышением способности нейтрофилов к образованию NETs. Обострение ОА демонстрировало дальнейший рост числа нейтрофилов, генерирующих NETs, как в процессе спонтанного, так и в процессе ФМА-индуцированного NETоза. У больных ОА в обострении доля спонтанного и индуцированного NETs значительно выше, чем при ОА в ремиссии. Темп прироста спонтанного образования ловушек выше индуцированного в 3,74 раза.

Таким образом, в ходе нашего исследования у больных ОА мы выявили статистически значимое

Адрес для переписки:

*Бедина Светлана Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. им. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Svetlana A. Bedina
A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental
Rheumatology
400138, Russian Federation, Volgograd, Zemlyachka str., 76.
Phone: +7 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru*

Образец цитирования:

*С.А. Бедина, Е.Э. Мозговая, А.С. Трофименко,
С.С. Спицина, М.А. Мамус «Влияние реактивного
воспаления при остеоартрите на образование
внеклеточных ловушек циркулирующих нейтрофилов»
// Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.
С. 1249-1254. doi: 10.15789/1563-0625-EOR-2537*

© Бедина С.А. и соавт., 2022

*Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*S.A. Bedina, E.E. Mozgovaya, A.S. Trofimenko, S.S. Spitsyna,
M.A. Mamus “Effect of reactive inflammation in osteoarthritis
on extracellular traps formation by circulating neutrophils”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1249-1254.
doi: 10.15789/1563-0625-EOR-2537*

© Bedina S.A. et al., 2022

*The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License*

DOI: 10.15789/1563-0625-EOR-2537

повышение способности нейтрофилов периферической крови к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек, зависящее от стадии заболевания. Полученные данные дают основание предполагать возможность участия циркулирующих нейтрофилов через NETоз в патогенезе иммунного воспаления при ОА.

Ключевые слова: остеоартрит, нейтрофилы, внеклеточные ловушки нейтрофилов, спонтанный NETоз, индуцированный NETоз, реактивное воспаление

EFFECT OF REACTIVE INFLAMMATION IN OSTEOARTHRITIS ON EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION BY CIRCULATING NEUTROPHILS

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A.

A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The results of recent studies demonstrating the presence of pro-inflammatory mediators in osteoarthritis (OA), as well as known similarity of histological signs of inflammation in rheumatoid arthritis (RA) and OA, suggest an important role of NETosis in immune inflammation in OA patients. Our objective was to assess ability of blood neutrophils from OA patients to generate NETosis spontaneously and after *in vitro* induction, and impact of reactive synovitis on the dynamics of NETosis indexes. Thirty-one patients with verified OA and 30 healthy volunteers were included into the study. Circulating neutrophils were isolated with one-step density gradient centrifugation using double layers of Iohexol gradient. Subpopulational profile of isolated neutrophil fractions, their viability, and nonspecific activation were evaluated microscopically using Trypan Blue exclusion test, as well as nitro-blue tetrazolium test. NETs were induced by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Spontaneous and induced formation of NETs was assessed using fluorescence microscopy. The OA patients were in clinical remission at the time of inclusion in the study. In 23 OA patients, an exacerbation was diagnosed during the study. The neutrophil fractions showed high purity and a high content of viable non-activated cells. These parameters were comparable in the study groups. Mean percentage of spontaneous NETs in OA patients in remission was significantly increased comparing to healthy controls. Usage of PMA, as inducing agent was accompanied by a significant increase in ability of neutrophils to form NETs. Transition of OA to exacerbation was characterized by further significant increase in spontaneous and PMA-induced NETs. Spontaneous and induced NETs in OA patients at acute stage of the disease are significantly higher than in OA patients in remission state. The growth rate of spontaneous NET formation is 3.74 times higher than the induced NET formation in OA patients upon exacerbation. Statistically significant increase in the ability of peripheral neutrophils to spontaneous and induced formation of extracellular traps was found, depending on the stage of osteoarthritis. The data obtained suggest an opportunity for participation of circulating neutrophils via NETosis in pathogenesis of immune inflammation in OA.

Keywords: osteoarthritis, neutrophils, NETs, spontaneous NETosis, induced NETosis, reactive inflammation

Введение

Остеоартрит (ОА) — наиболее часто диагностируемое заболевание опорно-двигательного аппарата, являющееся причиной большого количества прямых и косвенных социально-экономических издержек во всем мире [5, 6, 9]. Прогнозируется, что заболеваемость и распространенность ОА, которые на данный момент уже достигли масштабов эпидемии, резко возрастут в ближайшие десятилетия вследствие роста доли пожилых лиц, дальнейшего распространения избыточного веса в популяции из-за старения населения, роста показателей ожирения и высокого уровня травматического повреждения суставов [9]. Согласно этим прогнозам, к 2040 г. распространенность ОА

увеличится на 49%, затронет как минимум 78,4 млн взрослых в США и встанет в один ряд с основными причинами инвалидности и заболеваемости среди взрослых людей старше 40 лет [7]. Ожидается, что к 2030 году остеоартрит приведет к инвалидности почти 27 млн человек [4]. Несмотря на то, что заболевание является ведущей причиной нарушения подвижности у пожилых людей, а возраст считается важным предиктором ОА, развитие болезни не является неизбежным следствием старения [4, 5].

В настоящее время общепризнано, что в патогенезе заболевания и его прогрессировании существенную роль играют врожденные, а также адаптивные иммунологические механизмы, за-

пускающие воспалительные и метаболические процессы, приводящие к развитию хронического воспаления и разрушению тканей суставов. ОА поражает весь сустав и сопровождается деградацией суставного хряща, гиперплазией синовиальной оболочки, субхондральным склерозом и образованием остеофитов. Точные молекулярные механизмы, участвующие в деградации хрящевого матрикса и развитии ОА, изучены недостаточно [6].

В то же время обнаруженные при ОА морфологические изменения, характерные для воспаления (гиперплазия и мононуклеарно-клеточная инфильтрация синовиальной оболочки сустава), гистологически могут быть неотличимы от ревматоидной синовиальной инфильтрации [6]. Воспаление в виде клеточной инфильтрации синовиальной ткани или субхондральной кости, сопровождающееся экспрессией воспалительных цитокинов, все чаще признается триггером ОА [8]. Среди провоспалительных медиаторов наиболее важная роль при ОА принадлежит интерлейкинам (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-F5–IL-F10), TNF α , которые продуцируются синовиальной оболочкой, суставным хрящом и субхондральной костью, изменяют баланс деградации и восстановления хрящевого матрикса, что приводит к избыточной выработке протеолитических ферментов, ответственных за разрушение хряща. Изменение хряща, в свою очередь, усиливает синовиальное воспаление, создавая порочный круг [1]. Многие из провоспалительных медиаторов стимулируют образование внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs) в процессе программируемой гибели нейтрофилов (NETоз) при различных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Неконтролируемая генерация NETs является признанным фактором развития и прогрессирования ревматоидного артрита (РА) [10]. Кроме того, NETоз принимает участие в патогенезе системной красной волчанки, подагры, васкулитов, сердечно-сосудистых, воспалительных заболеваний легких, глаз, желудочно-кишечного тракта и онкологических заболеваний [3]. В то же время, как в отечественной, так и в зарубежной литературе, отсутствует информация об исследованиях, направленных на изучение NETоз у больных ОА и о возможном участии NETs в патогенезе заболевания. Вместе с тем результаты недавних исследований, демонстрирующих наличие провоспалительных медиаторов при ОА, схожесть гистологических признаков воспаления при РА и ОА, дают нам основание предположить не менее важную роль NETоза и в патогенезе ОА.

Цель исследования – оценить способность нейтрофилов периферической крови к спонтан-

ному и индуцированному образованию NETs у больных ОА и влияние реактивного синовита на динамику показателей NETоза.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации и рекомендациями по этике биомедицинских исследований, одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» (протокол № 1 от 14.11.2016 г.). В исследование был включен 61 человек, из них 31 (24 женщины и 7 мужчин, средний возраст – 50,4 \pm 1,7 лет) – больные с верифицированным ОА и 30 (9 мужчин и 21 женщина) условно здоровых лиц. Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту. Все больные находились на амбулаторном лечении в клинко-диагностическом отделении ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского». У 23 (74,2%) больных отмечалось обострение ОА с развитием синовита. Наличие синовита устанавливали при обнаружении характерных клинических признаков (усиление болевого синдрома в суставах, отек суставов и ограничение движений в них, появление экссудата в полости сустава) в сочетании с умеренным повышением лабораторных показателей (СОЭ и СРБ).

Циркулирующие нейтрофилы периферической крови выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола в оригинальной модификации с плотностью верхнего и нижнего слоев: 1080 кг/м³ и 1090 кг/м³, соответственно. Клеточную фракцию нейтрофилов, состоящую в основном из нейтрофилов низкой и средней плотности, отбирали из нижней интерфазы, на границе градиентов. После двукратного отмывания нейтрофилов от градиентов и примесей тромбоцитов в фосфатно-солевом буферном растворе определяли основные характеристики полученных фракций. Качественный состав фракций оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, окрашенных по методу Май-Грюнвальда, жизнеспособность клеток – методом исключения трипанового синего, степень активации – с помощью стандартного теста с нитросиним тетразолием [2]. В качестве индуктора образования NETs применяли раствор форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) (Merck/Sigma, США). Визуализировали спонтанное и индуцированное образование NETs с помощью флуоресцентной микроскопии (длина волны возбуждения 485 нм, эмиссии – 535 нм) после инкубации нейтрофилов в 100 мкл 1,25 мкМ SYBR Green в течение 10 минут. За NETs принимали четко определяемые, расположенные внеклеточно сетчатые структуры, превышающие

размер интактных гранулоцитов. Результат выражали в процентах, как относительное количество нейтрофилов с внеклеточными ловушками на 100 сосчитанных лейкоцитов при визуализации в образце не менее 200 клеток.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы STATISTICA 10.0 для Windows. Тип распределения анализировали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Результаты выражали как среднее арифметическое (95% доверительный интервал) (M (95 % ДИ). Верхние границы ДИ, превышающие 100%, усекали до 100%. Для сопоставления центральных тенденций использовали парный и непарный критерии Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Темп прироста показателей спонтанного и индуцированного образования NETs при обострении ОА по сравнению с предыдущим визитом вычисляли как частное от деления разницы конечного и исходного значений на исходное значение, умноженное на 100%.

Результаты и обсуждение

На момент включения в исследование все больные находились в стадии ремиссии. Первый контрольный визит (через 3 месяца) прошли все больные ОА, включенные в исследование, второй (через 8 месяцев) – 25 больных, третий (через 12 месяцев после включение в исследование) – 13 больных. 1 больной выбыл на втором визите и 2 – на третьем из-за отказа от дальнейшего участия в исследовании. В процессе исследования у больных ОА диагностировалось обострение заболевания: у 5 – на первом, у 10 – на втором и у 8 – на третьем визите. Такие пациенты составили груп-

пу больных ОА с синовитом. В целом у 23 (74,2%) больных отмечалось обострение ОА с развитием синовита, которое сопровождалось усилением боли в суставах, отеком и ограничением движений в суставах, появлением экссудата в полости суставов, а также умеренным повышением лабораторных показателей (M (95% ДИ)): СОЭ – 27,6 (25,3-29,9) мм/ч и СРБ – 6,5 (6,1-6,9) мг/л. Согласно классификации I. Kellgren и I. Lawrence II рентгенологическая стадия определялась у 11 (35,5%), III – у 18 (58,0%), IV – у 2 (6,5%) больных. В 67,7% случаев диагностировалось поражение коленных суставов, в 58,1% – суставов кистей, в 41,9% – тазобедренных, в 25,8% – голеностопных, в 16,1% – плечевых суставов. У большинства пациентов ОА (77,4%) определялось одновременное поражение нескольких суставов.

В ходе исследования образования NETs нами была использована усовершенствованная оригинальная методика выделения клеток с использованием в качестве градиента раствора йогексола. Это дало возможность получить нейтрофильные фракции с высокими показателями чистоты и жизнеспособности и низким процентом активированных клеток. Данные параметры в группе больных ОА были сопоставимыми с показателями здоровых лиц (рис. 1). Средняя доля нейтрофилов со спонтанным ловушкообразованием при ОА в состоянии ремиссии была существенно выше по сравнению со здоровыми лицами ($p = 0,012$) (рис. 2). Применение ФМА-индуктора сопровождалось значительным повышением способности нейтрофильных фракций к образованию внеклеточных ловушек у больных ОА в ремиссии ($p < 0,001$) (рис. 2). Ухудшение состояние больных ОА в результате обострения заболевания

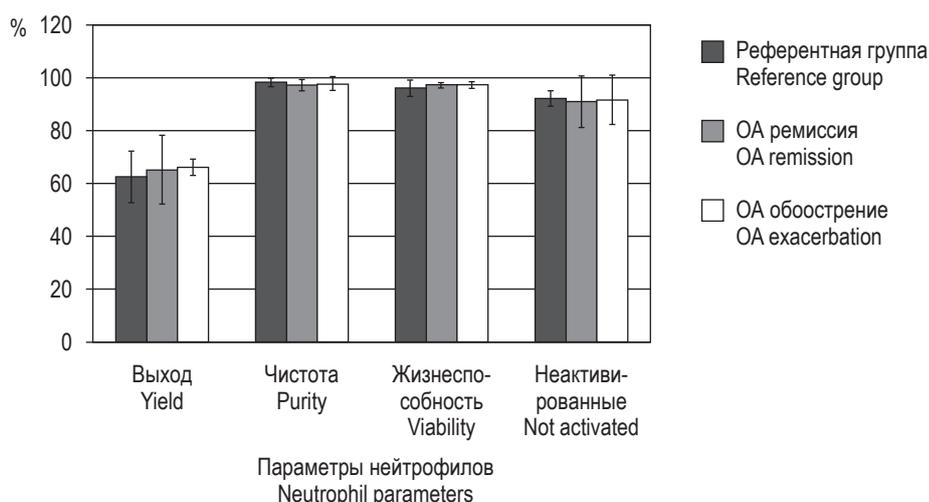


Рисунок 1. Основные показатели нейтрофилов в референтной группе и группе больных ОА на этапе включения в исследование и при обострении заболевания (M (95% ДИ))

Figure 1. Principal neutrophilic indicators both in reference group and OA at the inclusion point as well as during disease exacerbation (M (95% CI))

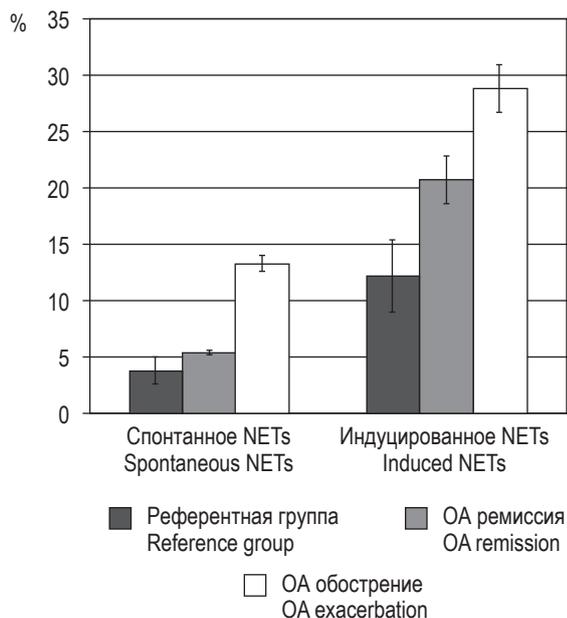


Рисунок 2. Динамика спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек нейтрофилов у больных ОА при обострении (М (95% ДИ))

Figure 2. Dynamics of spontaneous and induced neutrophil extracellular traps formation in OA patients during exacerbation (M (95% CI))

и развития синовита демонстрировало дальнейший рост числа нейтрофилов, генерирующих ловушки, как в процессе спонтанного, так и в процессе ФМА-индуцированного нетоза ($p < 0,0001$ для всех случаев) (рис. 2). В то же время у больных ОА в обострении доля спонтанного и индуцированного образования NETs значительно выше, чем при ОА в ремиссии ($p < 0,001$ для всех случаев). Темп прироста спонтанного образования ловушек выше индуцированного в 3,74 раза (рис. 3).

Таким образом, в ходе нашего исследования мы выявили статистически значимое повышение способности нейтрофилов периферической крови у больных ОА к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек, зависящее от стадии заболевания. У больных ОА в ремиссии по сравнению с группой здоровых лиц, спонтанное и индуцированное образование NETs выше на 42% и 70% соответственно. При переходе к обострению ОА эти показатели составили 250% и 136% соответственно для спонтанного и индуцированного образования NETs. Изменение показателей NETоза при ОА может свидетельствовать об участии NETs в патогенезе заболевания.

В то время как за последние десятилетия в отношении РА достигнут значительный прогресс, как в понимании его патогенеза [2, 10], так и в создании новых методов лечения, патофизиология ОА все еще изучена недостаточно. Возможно, полученные данные будут способствовать раскрытию некоторых механизмов патогенеза ОА в

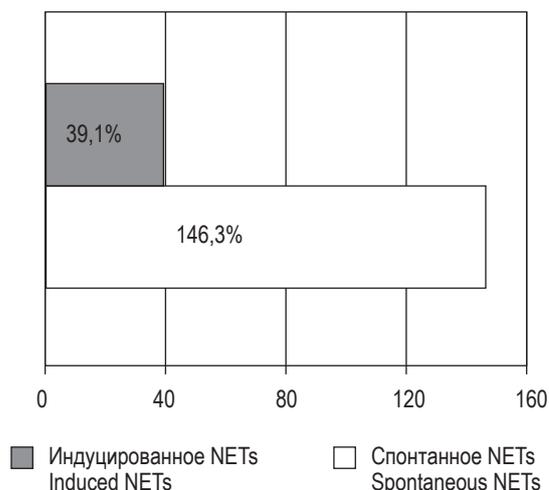


Рисунок 3. Темп прироста спонтанного и индуцированного образования NET у больных ОА

Figure 3. Growth rate of spontaneous and induced NET formation in OA patients

ближайшем будущем и обеспечат распознавание ранее неизвестных биологических маркеров болезни и разработку новых эффективных фармакологических методов лечения, направленных на контроль генерации NETs. В более ранних исследованиях мы показали рост способности нейтрофилов к спонтанной и индуцированной генерации NETs у больных РА в состоянии ремиссии [2]. Ряд зарубежных исследований демонстрирует увеличение образования NETs у больных с активным РА [10]. Однако в литературе отсутствуют данные о динамике образования NETs при переходе из состояния ремиссии к активному РА. В наших дальнейших исследованиях мы планируем изучить изменение основных параметров NETоза, ассоциированное с активацией аутоиммунного воспаления при РА, а также провести сравнительное исследование образования NETs при ОА с синовитом и активным РА.

Заключение

Нами изучены параметры образования нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных ОА в состоянии ремиссии, а также их динамика при переходе к обострению заболевания. Результаты нашего исследования демонстрируют повышенную способность циркулирующих периферических нейтрофилов как к спонтанному, так и к индуцированному образованию внеклеточных ловушек у больных ОА вне обострения, и дальнейший существенный рост NETоза, сопровождающий переход ремиссии в фазу обострения заболевания. Полученные данные дают нам основание предполагать возможность участия циркулирующих нейтрофилов через NETоз в патогенезе иммунного воспаления при ОА.

Список литературы / References

1. Бадокин В.В. Остеоартрит: от патогенеза к рациональной терапии. М., 2020. 248 с. [Badokin V.V. Osteoarthritis: from pathogenesis to natural therapy]. Moscow: 2020. 248 p.
2. Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С., Мамус М.А. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилами и моноцитами периферической крови больных ревматоидным артритом: изучение нового цитруллинсодержащего аутоантигена // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1165-1170. [Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A. Formation of extracellular traps by circulating neutrophils and monocytes in rheumatoid arthritis patients: a study of new citrullinated autoantigen. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1165-1170. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-FOE-2301.
3. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты // Вестник московского университета. Сер. 16. Биология, 2020. Т. 75. № 4. С. 210-225. [Vorobyeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Vestnik moskovskogo universiteta. Ser. 16. Biologiya = Bulletin of Moscow University. Ser. 16. Biology*, 2020, Vol. 75, no. 4, pp. 210-225. (In Russ.)]
4. Ashford S., Williard J. Osteoarthritis: A review. *Nurse Pract.*, 2014, Vol. 39, no. 5, pp. 1-8.
5. Chen D., Kim D.J., Shen J., Zou Z., O'Keefe R.J. Runx2 plays a central role in Osteoarthritis development. *J. Orthop. Translat.*, 2019, Vol. 23, pp. 132-139.
6. Geyer M., Schönfeld C. Novel insights into the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.*, 2018, Vol. 14, no. 2, pp. 98-107.
7. Hootman J.M., Helmick C.G., Barbour K.E., Theis K.A., Boring M.A. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable Activity limitation among US adults, 2015-2040. *Arthritis Rheum.*, 2016, Vol. 68, no. 7, pp. 1582-1587.
8. Hügle T., Geurts J., Nüesch C., Müller-Gerbl M., Valderrabano V. Aging and osteoarthritis: an inevitable encounter? *J. Aging Res.*, 2012, Vol. 2012, 950192. doi: 10.1155/2012/950192.
9. Mandl L.A. Osteoarthritis year in review 2018: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, Vol. 27, no. 3, pp. 359-364.
10. Song W., Ye J., Pan N., Tan C., Herrmann M. Neutrophil extracellular traps tied to rheumatoid arthritis: points to ponder. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 578129. doi: 10.3389/fimmu.2020.578129.

Авторы:

Бедина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Мозговая Е.Э. — к.м.н., ведущий научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Трофименко А.С. — к.м.н., заведующий клинико-биохимической лабораторией ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Спицина С.С. — младший научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Мамус М.А. — младший научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Bedina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Clinical Biochemical Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Mozgovaya E.E., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Clinical Biochemical Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Trofimenko A.S., PhD (Medicine), Head, Clinical Biochemical Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Spitsyna S.S., Junior Research Associate, Clinical Biochemical Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Mamus M.A., Junior Research Associate, Clinical Biochemical Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

АНАЛИЗ СИСТЕМЫ CD40 – ЛИГАНД CD40 У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ НЕКЛАПАННОГО ГЕНЕЗА

**Огуркова О.Н., Драгунова М.А., Сулова Т.Е., Лугачева Ю.Г.,
Баталов Р.Е.**

*Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия*

Резюме. Наиболее грозным осложнением фибрилляции предсердий является тромбоэмболический синдром, развивающийся в 8-15% случаев. Это указывает на роль сохраняющегося тромбообразования в левых отделах сердца на фоне приема антикоагулянтов у части больных. Тромбоциты при активации экспрессируют на своей мембране множество копий CD40L, поэтому растворимую форму лиганда CD40 рассматривают как маркер активации тромбоцитов и патологических процессов, связанных с повышением активности системы тромбообразования.

Цель – изучение содержания CD40, растворимого лиганда CD40 и тромбомодулина в сыворотке крови у больных с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза, получающих антикоагулянтную терапию и имеющих в анамнезе тромботические осложнения и пациентов с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений.

В исследование было включено 22 здоровых добровольца и 60 пациентов с диагнозом «фибрилляция предсердий», получающих антикоагулянтную терапию, из них у 21 пациента (35%) произошло развитие тромботических осложнений на фоне адекватной антикоагулянтной терапии. Все пациенты дали свое письменное информированное согласие на включение в исследование. Исследование CD40, растворимого лиганда CD40 и растворимого тромбомодулина проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Медиана концентрации растворимого лиганда CD40 в обеих группах пациентов с ФП значительно превышала значения в группе здоровых добровольцев. Содержание CD40L в группе пациентов с возникшими тромботическими осложнениями было увеличено по сравнению с группой пациентов без тромбозов. Статистически значимой разницы в содержании CD40 между группами больных и по сравнению со здоровыми добровольцами обнаружено не было. Содержание растворимого тромбомодулина в сыворотке крови у пациентов с тромботическими осложнениями снижено по сравнению как с группой пациентов без тромбозов, так и с группой здоровых добровольцев.

Исследование системы CD40/CD40L и тромбомодулина показало, что у пациентов с тромботическими осложнениями отмечено повышение в сыворотке крови растворимого CD40L, с одновремен-

Адрес для переписки:

*Огуркова Оксана Николаевна
Научно-исследовательский институт кардиологии
634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111а.
Тел.: 8 (960) 975-45-44.
E-mail: ogurkovaon@mail.ru*

Address for correspondence:

*Oksana N. Ogurkova
Research Institute of Cardiology
634012, Russian Federation, Tomsk, Kieskaya str., 111a.
Phone: +7 (960) 975-45-44.
E-mail: ogurkovaon@mail.ru*

Образец цитирования:

*О.Н. Огуркова, М.А. Драгунова, Т.Е. Сулова,
Ю.Г. Лугачева, Р.Е. Баталов «Анализ системы CD40 –
лиганд CD40 у пациентов с фибрилляцией предсердий
неклапанного генеза» // Медицинская иммунология,
2022. Т. 24, № 6. С. 1255-1264.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2532*

*© Огуркова О.Н. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*O.N. Ogurkova, M.A. Dragunova, T.E. Suslova,
Yu.G. Lugacheva, R.E. Batalov “Evaluation of the CD40
receptor-ligand system in the patients with atrial fibrillation
of non-valvular genesis”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6,
pp. 1255-1264. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2532*

*© Ogurkova O.N. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2532*

ным снижением содержания уровня физиологического антикоагулянта тромбомодулина. Сравнительный анализ показателей системы CD40/sCD40L продемонстрировал повышенные концентрации биомаркеров у женщин по сравнению с мужчинами.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, тромбоэмболия, воспаление, тромбообразование, система CD40-40L, тромбомодулин

EVALUATION OF THE CD40 RECEPTOR-LIGAND SYSTEM IN THE PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION OF NON-VALVULAR GENESIS

Ogurkova O.N., Dragunova M.A., Suslova T.E., Lugacheva Yu.G., Batalov R.E.

Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Thromboembolic syndrome is the most dangerous complication of atrial fibrillation which develops in about 8-15% of cases, thus presuming the role of persisting left-heart thrombosis in presence of anticoagulant therapy in some patients. When activated, the blood platelets express multiple copies of CD40L on their membrane. Hence, the soluble form of CD40 ligand is considered a marker of platelet activation and pathogenic processes associated with increased activity of the thrombotic system.

Our aim was to study the content of CD40, soluble CD40 ligand and thrombomodulin in the patients with atrial fibrillation of non-valvular genesis receiving anticoagulant therapy, discerning those with a history of thrombotic complications, and the cases with atrial fibrillation, however, free of thrombotic complications.

The study group included 22 healthy volunteers and 60 patients diagnosed with atrial fibrillation who received anticoagulant therapy, of whom 21 patients have developed thrombotic complications in the course of adequate anticoagulant therapy. Quantitative assays of CD40, soluble CD40 ligand and soluble thrombomodulin were performed by enzyme immunoassay using Core Facility "Medical Genomics", Tomsk National Research Medical Center.

Concentration of soluble CD40 ligand in both groups of the patients with atrial fibrillation significantly exceeded appropriate values in the group of healthy volunteers. CD40L content was increased in the group of patients with thrombotic complications against the group of patients without thrombotic complications. Thrombomodulin content in blood serum was decreased in the patients with thrombotic complications, as compared to both thrombosis-free patients, and to practically healthy volunteers.

The study of CD40/CD40L system and thrombomodulin showed that the patients with thrombotic complications exhibited higher serum level of soluble CD40L, with a simultaneous decrease of thrombomodulin, a physiological anticoagulant. A comparative analysis of the CD40/sCD40L system showed increased concentrations of the biomarkers in females, when compared to males.

Keywords: atrial fibrillation, thromboembolism, inflammation, thrombosis, CD40-40L system, thrombomodulin

Введение

Наиболее грозным осложнением фибрилляции предсердий (ФП) является тромбоэмболический синдром, развивающийся в 8-15% случаев [11]. Основным источником эмбологенных тромбов при неклапанной ФП является левое предсердие или его ушко. Вместе с тем часть инсультов у больных с ФП имеет другую этиологию (в частности атеротромботическую, особенно в пожилом и старческом возрасте) [12]. Перораль-

ные антикоагулянты позволяют уменьшить риск инсульта при ФП, однако частота инсультов и периферических тромбоэмболий на фоне использования антикоагулянтов остается достаточно высокой. Это может указывать на роль сохраняющегося тромбообразования в левых отделах сердца на фоне приема антикоагулянтов у части больных. В последние годы достигнут значительный прогресс в выявлении ФП и ее лечении [2, 3]. Однако по-прежнему риск развития тромбо-

эмболических осложнений (ТЭО), в том числе ишемического инсульта, у пациентов с ФП в 5 раз превышает таковой у пациентов с синусовым ритмом, поэтому одним из основных направлений лечения пациентов с данным нарушением ритма является профилактика ТЭО [6, 11]. Образованию тромбов в ушке левого предсердия способствуют его анатомические особенности: узкая конусовидная форма, а также неровность внутренней поверхности, обусловленная наличием гребенчатых мышц и мышечных трабекул [12]. В последние годы активно изучаются взаимосвязи между тромбозом и воспалением, так как известно, что не только воспаление сопровождается повышением активности системы свертывания крови, но и тромбообразование в свою очередь приводит к активации воспаления [1, 7]. Одним из механизмов, связывающих воспаление и тромбообразование, является активация системы CD40/CD40L. Рецептор CD40 и его лиганд CD40-трансмембранные гликопротеиды, относящиеся к семейству рецепторов факторов некроза опухоли, экспрессируются различными клетками: В-лимфоцитами и активированными CD4⁺T-лимфоцитами, макрофагами/моноцитами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Растворимая форма CD40L экспрессируется на поверхности тромбоцитов при их активации, а рецептор CD40 также можно обнаружить на тромбоцитарной поверхности [8, 9]. Тромбоциты являются метаболически активными клетками, в последние годы получено большое количество данных, свидетельствующих, что тромбоциты могут быть источниками как протромбогенных, так и провоспалительных медиаторов. Антитромботическая профилактика при фибрилляции предсердий является важной задачей для изучения, поскольку проблема ТЭО остается не решенной. В связи с этим, нам представляется актуальным изучение возможной роли системы CD40/CD40L в развитии тромбоэмболических осложнений у больных ФП.

Цель исследования – изучение содержания CD40, растворимого лиганда CD40 и тромбомодулина в сыворотке крови у больных с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза, получающих антикоагулянтную терапию и имеющих в анамнезе тромботические осложнения и пациентов с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений.

Материалы и методы

В исследование было включено 22 здоровых добровольца и 60 пациентов старше 18 лет с диагнозом «фибрилляция предсердий» (средний воз-

раст 56,6±17,9), верифицированном на основании клинических рекомендаций (рекомендации ESC 2020 по диагностике и лечению фибрилляции предсердий), подтвержденным по ЭКГ, с точным монитированием ЭКГ, получающих антикоагулянтную терапию. Из них у 21 пациента (35%) произошло развитие тромботических осложнений на фоне адекватной антикоагулянтной терапии. Терапия, принимаемая пациентами на момент включения в исследование, соответствовала современным рекомендациям и включала в себя стандартную общепринятую антиаритмическую и антикоагулянтную терапию, а также терапию основного сердечно-сосудистого заболевания (бета-адреноблокаторы, статины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, диуретики). При наличии показаний и при отсутствии противопоказаний – проводилось эндокардиальное ЭФИ и РЧА с использованием нефлюороскопической навигационной системы CARTO 3 EP (BiosenseWebster, США). Критерии невключения субъектов: противопоказания к приему антикоагулянтов, хроническая сердечная недостаточность с выраженным снижением фракции выброса левого желудочка менее 40% и значительной дилатацией полостей сердца, клапанная патология сердца, беременные или женщины детородного возраста, планирующие беременность на время проведения исследования, недееспособные пациенты по психоневрологическим состояниям. Все пациенты дали свое письменное информированное согласие на включение в исследование. Исследование маркеров CD40 (пг/мл), растворимого лиганда CD40 (sCD40L) (нг/мл) и растворимого тромбомодулина (sTM) (нг/мл) проводилось методом иммуноферментного анализа с помощью диагностических наборов фирмы Biomedica GmbH, Austria, с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Результаты и обсуждение

Среди всех включенных в исследование пациентов тромботические осложнения при ФП без поражения клапанного аппарата сердца были следующие: тромбоз ушка левого предсердия отмечен у 10 пациентов (17%), спонтанное эхоконтрастирование П и более степени у 6 больных (10%), кардиоэмболический инсульт – у 4 пациентов (7%), тромбоз периферических артерий – 1 (2%), тромбоз на электродах ЭКС – 2 (4%). Все пациенты были разделены на две группы: группа 1 – пациенты с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений, группа 2 – пациенты с фибрилляцией предсердий с возникшими тромботическими осложнениями.

Пациенты исследуемых групп были сопоставимы по возрасту, полу, функциональному классу ХСН, наличию ИБС, артериальной гипертензии, а также по частоте применения основных групп лекарственных препаратов. Основные клинико-анамнестические параметры пациентов исследуемых групп представлены в таблице 1. Также все пациенты были поделены в две группы по гендерному различию: группу А составили женщины, группу В – мужчины. В таблице 2 представлены данные содержания в сыворотке крови биомаркеров CD40, растворимого лиганда CD40 и растворимого тромбомодулина у пациентов с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев. Статистически значимой разницы в содержании CD40 между группами больных и по сравнению со здоровыми добровольцами обнаружено не было. Медиана концентрации растворимого лиганда CD40 в обеих группах пациентов с ФП значительно превышала значения в группе здоровых добровольцев. Также было обнаружено увеличение содержания растворимого CD40L в группе пациентов с возникшими тромботическими осложнениями по сравнению с группой пациентов без них. Медиана содержания растворимого тромбомодулина в сыворотке крови у пациентов с тромботическими осложнениями была снижена по сравнению как с группой пациентов без осложнений, так и с группой практически здоровых добровольцев. Содержание растворимого тромбомодулина в группе пациентов без тромботических осложнений не отличалось от группы здоровых добровольцев.

Доля пациентов, вошедших в исследование и принимающих статины для коррекции липидного обмена, составила 85–87%. Известно, что статины обладают многочисленными плеiotропными эффектами: противовоспалительным, антиоксидантным, кардиопротективным и антиаритмическим. Участвуют в нормализации массы тела и гормонального фона, приводят к улучшению эндотелиальной функции, антитромботический эффект статинов реализуется за счет увеличения экспрессии тромбомодулина [4, 5]. При проведении корреляционного анализа в общей группе пациентов были получены положительные взаимосвязи уровня CD40 и общего холестерина, $r = 0,57$; CD40 и холестерина ЛПНП, $r = 0,62$ и обратная взаимосвязь между содержанием растворимого лиганда CD40 и холестерином ЛПВП, $r = -0,73$; $p < 0,05$, что может свидетельствовать в пользу роли сигналинга системы CD40-CD40L для запуска и прогрессирования атеросклеротического процесса и развития острых тромботических событий, что также было показано в других исследованиях [7, 9].

Следующим этапом нашего исследования было проведение сравнительного анализа системы CD40/CD40L и тромбомодулина у женщин и мужчин с фибрилляцией предсердий и у здоровых добровольцев, данные представлены в таблице 3. Было отмечено повышенное содержание в крови CD40 у женщин без тромбоэмболических осложнений и у здоровых женщин по сравнению с мужчинами. В группе пациентов с возникшими тромботическими осложнениями у мужчин и женщин не было различий по содержанию CD40 в сыворотке крови. Медиана концентрации растворимого лиганда CD40 у женщин во всех группах больных превышала значение данного показателя у мужчин, наиболее высокий уровень отмечался у женщин в группе с тромботическими осложнениями. При этом, в группе с тромбозами, как у женщин, так и у мужчин отмечено повышенное содержание sCD40L по сравнению с группой без тромботических осложнений и с группой здоровых добровольцев. У мужчин в группе без тромбозов были выявлены положительные корреляции уровня sCD40L с возрастом $r = 0,60$ и размером левого предсердия $r = 0,50$; $p < 0,05$. Сравнительный анализ уровня растворимого тромбомодулина у женщин и мужчин во всех группах больных с фибрилляцией предсердий и у здоровых добровольцев не выявил статистически значимых различий.

CD40/CD40L-индуцированная сигнализация представляет огромный интерес для клеточного сигналинга во врожденном и адаптивном иммунитете. Система CD40/CD40L связана как с протромботическими, так и с провоспалительными эффектами. Мембраносвязанная форма CD40L высоко экспрессируется в основном активированными тромбоцитами, поэтому растворимую форму лиганда CD40 рассматривают как маркер активации тромбоцитов и патологических процессов, связанных именно с повышением активности системы тромбообразования. Растворимый CD40L вносит вклад в патофизиологию атеросклероза и атеротромбоза, вызывая эндотелиальную дисфункцию со снижением синтеза NO и усилением окислительного стресса, что может способствовать повреждению эндотелия [8]. Тромбомодулин широко экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток и в присутствии цитокинов, активированных нейтрофилов и макрофагов эндотелиальный тромбомодулин расщепляется ферментативно, высвобождая растворимые фрагменты, которые циркулируют в крови. Растворимый тромбомодулин оказывает ингибирующее действие на активацию тромбоцитов тромбином. Повышение уровня физиологических антикоагулянтов никогда не приводит к кровотечениям, в то время как снижение их

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION

Параметры Parameters	Пациенты без тромботических осложнений Группа 1 Patients without thrombotic complications Group 1 (n = 39)	Пациенты с тромботическими осложнениями Группа 2 Patients with thrombotic complications Group 2 (n = 21)	p
Возраст, лет Age, years	60,20±1,73	66,09±3,14	0,76
Половое соотношение, м/ж Sex ratio, m/w	21/18	11/10	0,57/0,56
Функциональный класс СН (NYHA), n (%) Functional class of heart failure:			
I	6 (15)	4 (19)	0,51
II	22 (56)	9 (43)	0,37
III	4 (10)	5 (24)	0,20
Давность аритмии, г Age of arrhythmia, years	9,23±1,12	10,73±2,12	0,61
Артериальная гипертония, n (%) Arterial hypertension, n (%)	30 (76)	17 (81)	0,53
Ишемическая болезнь сердца, n (%) Coronary heart disease, n (%)	25 (64)	16 (76)	0,42
Форма фибрилляции предсердий, n (%): Form of atrial fibrillation, n (%):			
впервые возникшая first-time	–	2 (9)	0,26
пароксизмальная форма paroxysmal form	19 (49)	7 (3)	0,62
персистирующая форма persistent form	20 (51)	12 (57)	0,49
Медикаментозная терапия на момент исследования Medication therapy at the time of the study			
Антикоагулянтная терапия: Anticoagulant therapy:			
Варфарин, n (%) Warfarin, n (%)	8 (20)	8 (38)	0,42
Ксарелто, n (%) Xarelto, n (%)	19 (48)	5 (24)	0,31
Прадакса, n (%) Pradaxa, n (%)	1 (2)	1 (5)	0,75
Эликвис, n (%) Eliquis, n (%)	11 (28)	8 (38)	0,77
Антиагрегантная терапия: Antiaggregant therapy:			
Аспирин, n (%) Aspirin, n (%)	–	2 (9)	0,26
Клопидогрель, n (%) Clopidogrel, n (%)	–	2 (9)	0,26
Нет, n (%) None, n (%)	39 (100)	15 (71)	0,26

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Параметры Parameters	Пациенты без тромботических осложнений Группа 1 Patients without thrombotic complications Group 1 (n = 39)	Пациенты с тромботическими осложнениями Группа 2 Patients with thrombotic complications Group 2 (n = 21)	p
Статины, n (%) Statins, n (%)	33 (85)	13 (85)	0,30
Бета-блокаторы, n (%) Beta-blockers, n (%)	12 (31)	13 (62)	0,08
Ингибиторы АПФ ACE inhibitors	25 (64)	17 (81)	0,36
Диуретики Diuretics	5 (13)	3 (14)	0,79
Антиаритмическая терапия: Antiarrhythmic therapy:			
Пропанорм, n (%) Propanorm, n (%)	3 (8)	1 (5)	0,89
Кордарон, n (%) Cardarone, n (%)	6 (15)	7 (33)	0,34
Соталекс, n (%) Sotalex, n (%)	5 (13)	4 (19)	0,86
Тромботические осложнения Thrombotic complications			
Тромбоз ушка ЛП, n (%) Left atrial auricular thrombosis, n (%)	–	10 (48)	0,0001
Спонтанное эхоконтрастирование, n (%) Spontaneous echocontrasting, n (%)	–	6 (28)	0,008
Тромбоз правого предсердия, n (%) Right atrial thrombosis, n (%)	–	1 (5)	0,77
Инсульт кардиоэмболический n (%) Cardioembolic stroke, n (%)	–	4 (19)	0,04
Тромб на электроде ЭКС, n (%) Right ventricular electrode thrombus, n (%)	–	2 (9)	0,25
Тромбоз периферических артерий, n (%) Peripheral artery thrombosis, n (%)	–	1 (5)	0,77

Примечание. Данные представлены в виде % и медианы Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) для непрерывных ненормально распределенных переменных.

Note. Data are presented as the % and median Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) for continuous non-normally distributed variables.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ CD40, CD40L И ТРОМБОМОДУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

TABLE 2. SERUM CD40, CD40L, AND THROMBOMODULIN CONTENT IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION AND HEALTHY VOLUNTEERS

Параметры Parameters	Пациенты без тромботических осложнений Группа 1 Patients without thrombotic complications Group 1 (n = 39)	Пациенты с тромботическими осложнениями Группа 2 Patients with thrombotic complications Group 2 (n = 21)	Здоровые добровольцы Healthy volunteers (n = 22)
CD40 (нг/мл) CD40 (pg/mL)	42,80 (30,96-65,52)	54,48 (37,73-63,98)	51,04 (37,10-67,20)
sCD40L (нг/мл) sCD40L (ng/mL)	12,92* (7,66-18,45)	15,67* ** (10,82-19,21)	8,04 (3,68-13,57)
sТромбомодулин (нг/мл) sThrombomodulin (ng/mL)	2,54** (2,01-2,89)	2,09* ** (1,75-2,40)	2,84 (2,30-3,31)

Примечание. Данные представлены в виде медианы Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$) для непрерывных ненормально распределенных переменных. * $p < 0,05$ – при сравнении групп пациентов с ФП с группой здоровых добровольцев; ** $p < 0,05$ – при сравнении групп 1 и 2.

Note. Data are presented as the median Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$) for continuous non-normally distributed variables; *, $p < 0.05$, statically significant groups of patients with atrial fibrillation with a group of healthy volunteers; **, $p < 0.05$, statically significant within the group 1 vs group 2.

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИСТЕМЫ CD40/CD40L И ТРОМБОМОДУЛИНА У ЖЕНЩИН И МУЖЧИН

TABLE 3. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CD40/CD40L SYSTEM AND THROMBOMODULIN IN WOMEN AND MEN

Параметры Parameters	Пациенты без тромботических осложнений Группа 1 Patients without thrombotic Complications Group 1 (n = 39)		Пациенты с тромботическими осложнениями Группа 2 Patients with thrombotic complications Group 2 (n = 21)		Здоровые добровольцы Healthy volunteers (n = 22)	
	Группа А Group A (n = 18)	Группа В Group B (n = 21)	Группа А Group A (n = 10)	Группа В Group B (n = 11)	Группа А Group A (n = 11)	Группа В Group B (n = 11)
CD40 (нг/мл) CD40 (pg/mL)	56,25** (41,30-71,68)	36,86** (23,64-56,84)	55,76 (36,66-59,58)	52,18 (37,82-63,98)	64,86** (36,38-76,48)	39,10 (37,10-45,58)
sCD40L (нг/мл) sCD40L (ng/mL)	15,83* ** (12,83-19,01)	9,58** (6,19-15,41)	17,98* *** (14,71-19,58)	14,07* (9,83-17,95)	8,04 (1,80-15,23)	6,83 (3,83-13,57)
sТромбомодулин (нг/мл) sThrombomodulin (ng/mL)	2,65 (1,99-2,92)	2,30* (2,01-2,81)	1,91* (1,80-2,53)	2,15 * (1,94-2,50)	2,60 (1,83-3,07)	3,03 (2,55-3,31)

Примечание. Данные представлены в виде медианы Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$) для непрерывных ненормально распределенных переменных. * $p < 0,05$ – при сравнении групп пациентов с ФП с группой здоровых добровольцев; ** $p < 0,05$ – при сравнении группы А (женщины) и группы В (мужчины); *** $p < 0,05$ – при сравнении групп 1 и 2.

Note. Data are presented as the median Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$) for continuous non-normally distributed variables. *, $p < 0.05$, statically significant groups of patients with atrial fibrillation with a group of healthy volunteers; **, $p < 0.05$, statically significant within the group A (women) vs group B (men); ***, $p < 0.05$, statically significant within the group 1 vs group 2.

содержания существенно повышает риск тромбозов [13]. Также известно, что после взаимодействия CD40L и CD40 на поверхности эндотелия экспрессия тромбомодулина снижается, что облегчает образование тромбина [10]. Полученные в нашем исследовании результаты указывают на связь повышенного содержания в сыворотке крови растворимого CD40L при сниженном уровне тромбомодулина с риском развития тромбоэмболических осложнений у пациентов с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза.

Заключение

Исследование системы CD40/CD40L и тромбомодулина показало, что у пациентов с тромбо-

тическими осложнениями, возникшими на фоне адекватной антикоагулянтной терапии отмечено повышение в сыворотке крови растворимого CD40L, с одновременным снижением содержания уровня физиологического антикоагулянта тромбомодулина. Сравнительный анализ показателей системы CD40/sCD40L продемонстрировал повышенные концентрации биомаркеров у женщин по сравнению с мужчинами. Представленные данные свидетельствуют о несомненном участии системы CD40/sCD40L в увеличении протромбогенного и провоспалительного потенциала у пациентов с фибрилляцией предсердий при наличии дефицита естественного ингибитора коагуляции тромбомодулина.

Список литературы / References

1. Бондарь И.А., Климонтов В.В. Система CD40 – лиганд CD40 в развитии сахарного диабета и его осложнений // Сахарный диабет, 2011. Т. 14, № 3. С. 21-25. [Bondar I.A., Klimontov V.V. The role of CD40 receptor-ligand system in the development of diabetes mellitus and its complications. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2011, Vol. 14, no. 3, pp. 21-25. (In Russ.)]
2. Евтушенко А.В., Евтушенко В.В., Петлин К.А., Беленкова Е.М. Способ достижения трансмуральности повреждения миокарда предсердий при лечении наджелудочковых аритмий и устройство для его осуществления. Патент на изобретение RU 2394522 C2. [Evtushenko A.V., Evtushenko V.V., Petlin K.A., Belenkova E.M. A method for achieving transmural damage of atrial myocardium in the treatment of supraventricular arrhythmias and a device for its implementation. Patent for invention RU 2394522 C2].
3. Евтушенко А.В., Евтушенко В.В., Павлюкова Е.Н., Попов С.В. Монополярная радиочастотная абляция длительно персистирующей фибрилляции предсердий у пациентов с пороками сердца и хронической сердечной недостаточностью. Томск: НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, 2019. 238 с. [Evtushenko A.V., Evtushenko V.V., Pavlyukova E.N., Popov S.V. Monopolar radiofrequency ablation of long persistent atrial fibrillation in patients with cardiac defects and chronic heart failure]. Tomsk: Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, 2019. 238 p.
4. Загидуллин Н.Ш., Michels G., Загидуллин Ш.З. Статины и их антиаритмическая активность // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2007. Т. 6, № 8. С. 116-121. [Zagidullin N.S., Michels G., Zagidullin S.Z. Statins and their antiarrhythmic activity. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2007, Vol. 6, no. 8, pp. 116-121. (In Russ.)]
5. Огуркова О.Н., Сулова Т.Е., Левашкина Е.А., Кулагина И.В., Кошельская О.А. Исследование влияния аторвастатина на уровень лептина, инсулина, С-реактивного белка и показатели липидного спектра в сыворотке крови женщин с ишемической болезнью сердца и ожирением // Сибирский медицинский журнал, 2010. Т. 25, № 2, Вып. 2. С. 25-29. [Ogurkova O.N., Suslova T.E., Levashkina E.A., Kulagina I.V., Koshelskaya O.A. Research of atorvastatin influence on the level of leptin, insulin, C-reactive protein and indicators of fats in blood serum of women with ischemic heart disease and obesity. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2010, Vol. 25, no. 2, Iss. 2, pp. 25-29. (In Russ.)]
6. Ревিশвили А.Ш., Бойцов С.А., Давтян К.В., Зенин С.А., Кузнецов В.А., Купцов В.В., Лебедев Д.С., Ломидзе Н.Н., Медведев М.М., Недоступ А.В., Неминуший Н.М., Певзнер А.В., Покушалов Е.А., Рзаев Ф.Г., Татарский Б.А., Термососов С.А., Тюрина Т.В., Шубик Ю.В., Яшин С.М. Клинические рекомендации по проведению электрофизиологических исследований, катетерной абляции и применению имплантируемых антиаритмических устройств. 2017. С. 466-595. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://webmed.irkutsk.ru/doc/pdf/vnoa.pdf> [Revishvili A.Sh., Boytsov S.A., Davtyan K.V., Zenin S.A., Kuznetsov V.A., Kuptsov V.V., Lebedev D.S., Lomidze N.N., Medvedev M.M., Nekhod A.V., Neminushchy N.M., Pevsner A.V., Pokushalov E.A., Rzaev F.G., Tatarsky B.A., Thermosesov S.A., Tyurina T.V., Shubik Yu.V., Yashin S.M. Clinical guidelines for electrophysiological studies, catheter ablation, and the use of implantable antiarrhythmic devices]. 2017, pp. 466-595. [Electronic resource]. Access mode: <https://webmed.irkutsk.ru/doc/pdf/vnoa.pdf>.
7. Шевченко О.П., Природова О.Ф., Шевченко А.О. Клиническое значение растворимого CD40 лиганда у больных ишемической болезнью сердца // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2006. Т. 5, № 7. С. 101-111. [Shevchenko O.P., Prirodova O.F., Shevchenko A.O. Clinical value of soluble CD40 ligand in coronary

heart disease patients. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2006, Vol. 5, no. 7, pp. 101-111. (In Russ.)]

8. Aloui C., Prigent A., Sut C., Tariket S., Hamzeh-Cognasse H., Pozzetto B., Richard Y., Cognasse F., Laradi S., Garraud O. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 22342-22364.

9. Anand S.X., Viles-Gonzalez J.F., Badimon J.J., Cavusoglu E., Marmur J.D. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb. Haemost.*, 2003, Vol. 90, no. 3, pp. 377-384.

10. Giri H., Cai X., Panicker S.R., Biswas I., Rezaie A.R. Thrombomodulin regulation of mitogen-activated protein kinases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 8, 1851. doi: 10.3390/ijms20081851.

11. Hindricks G., Potpara T., Dagres N., Arbelo E., Bax J.J., Blomström-Lundqvist C., Boriani G., Castella M., Dan G.-A., Dilaveris P.E., Fauchier L., Filippatos G., Kalman J.M., La Meir M., Lane D.A., Lebeau J.-P., Lettino M., Lip G.Y.H., Pinto F.J., Thomas G.N., Valgimigli M., Van Gelder I.C., Van Putte B.P., Watkins C.L., ESC Scientific Document Group. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association of Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur. Heart J.*, 2021, Vol. 42, Iss. 5, pp. 373-498.

12. Kirchhof P., Benussi S., Kotecha D., Ahlsson A., Atar D., Casadei B., Castella M., Diener H.-C., Heidbuchel H., Hendriks J., Hindricks G., Manolis A.S., Oldgren J., Popescu B.A., Schotten U., Van Putte B., Vardas P., Agewall S., Camm J., Esquivias G.B., Budts W., Carerj S., Casselman F., Coca A., de Caterina R., Deftereos S., Dobrev D., Ferro J.M., Filippatos G., Fitzsimons D., Gorenek B., Guenoun M., Hohnloser S.H., Kolh P., Lip G.Y.H., Manolis A., McMurray J., Ponikowski P., Rosenhek R., Ruschitzka F., Savelieva I., Sharma S., Suwalski P., Tamargo J.L., Taylor C.J., Van Gelder I.C., Voors A.A., Windecker S., Zamorano J.L., Zeppenfeld K. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. Left atrial volume predicts cardiovascular events in patients originally diagnosed with lone atrial fibrillation: three-decade follow-up. *Eur. Heart J.*, 2016, Vol. 37, Iss. 38, pp. 2893-2962.

13. Okuda A., Ogura T., Imanishi M., Miyano A., Nishioka N., Higuchi K. Clinical impact of recombinant soluble thrombomodulin for disseminated intravascular coagulation associated with severe acute cholangitis. *Gut Liver*, 2018, Vol. 12, no. 4, pp. 471-477.

Авторы:

Огуркова О.Н. — к.м.н., научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Драгунова М.А. — к.м.н., научный сотрудник отделения хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Authors:

Ogurkova O.N., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Dragunova M.A., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Surgical Treatment of Complex Heart Rhythm Disorders and Electrostimulation, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Суслова Т.Е. — к.м.н., руководитель отделения клинической лабораторной диагностики Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Лугачева Ю.Г. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики клиничко-диагностической лаборатории Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Баталов Р.Е. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Suslova T.E., PhD (Medicine), Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Lugacheva Yu.G., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Clinical Diagnostic Laboratory, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Batalov R.E., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Surgical Treatment of Complex Heart Rhythm Disorders and Electrocardiostimulation, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Поступила 10.06.2022
Принята к печати 27.06.2022

Received 10.06.2022
Accepted 27.06.2022

СЛУЧАЙ ДЛИТЕЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Корженевский А.А.^{1,2}, Корженевская Н.П.¹

¹ ГБУЗ «Республиканская клиническая больница имени Г.Г. Куватова», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

² ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Резюме. Представлен случай длительного (около 10 лет) функционирования органа после аллотрансплантации трупной почки без использования иммунодепрессантов. В 2005 году пациенту, страдающему гипертонической формой хронического гломерулонефрита, при наличии совместимости по АВ0 системе, антигенам гистосовместимости А19, В07, DR04 и при отрицательном Cross-match была проведена аллотрансплантация трупной почки. Функция трансплантата была немедленная, нормализация уровня креатинина достигнута на 4-5-е сутки после операции. В стационаре проводилась иммуносупрессия циклоспорином, солумедролом, селлсептом, метипредом и симулектом. На 20-е сутки связи с появлением признаков начинающегося криза отторжения проведена пульс-терапия солумедролом. Послеоперационный период протекал без инфекционных осложнений. Выписан с рекомендациями принимать циклоспорин, селлсепт и метипред. После операции трансплантации в том же году у пациента появились боли в тазобедренном суставе, в связи с чем был полностью отменен метипред. В последующем осуществлена замена селлсепта на майфортик. В 2007 г. при проведении компьютерной томографии были выявлены признаки коксартроза, затем был констатирован асептический некроз головки правой бедренной кости, деформирующий остеоартроз правого тазобедренного сустава и встал вопрос об операции по эндопротезированию тазобедренного сустава. В 2010 г., опасаясь развития побочных эффектов от проводимой иммуносупрессивной терапии, в том числе усугубления поражения суставов, пациент самостоятельно отменил прием майфортика. В 2012 г., опасаясь развития нежелательных последствий от замены оригинального сандиммун неорала дженериками, пациент полностью отказался от приема циклоспорина. В 2021 г. было проведено эндопротезирование правого тазобедренного сустава, рана зажила первично. С 2012 г. пациент полностью не принимал иммуносупрессивную терапию. За это время он ни разу не поступал в стационар по поводу ухудшения функции трансплантата. Но при этом он регулярно контролировал функцию трансплантата по результатам биохимических анализов, клинической картине, УЗИ трансплантата и приходил на амбулаторный прием. В 2021 г., через неделю после эндопротезирования тазобедренного сустава, отметился незначительный рост уровня креатинина в сыворотке крови, в 2021 г. он уже был 230 мкмоль/л, в марте 2022 г. — 310 мкмоль/л. В феврале 2022 г. пациент перенес ОРВИ коронавирусной природы в легкой форме. В марте 2022 г. появились первые клинически признаки нарастающей нефропатии — отечность обеих нижних конечностей, в общем анализе мочи — лейкоцитурия, по данным УЗИ — увели-

Адрес для переписки:

Корженевский Алексей Арнольдович
ГБУЗ «Республиканская клиническая больница
имени Г.Г. Куватова»
450005, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа,
ул. Достоевского, 109, кв. 19.
Тел.: 8 (919) 619-85-60.
E-mail: koral@ufanet.ru

Address for correspondence:

Alexey A. Korzhenevsky
G. Kuvatov Republican Clinical Hospital
450005, Russian Federation, Republic of Bashkortostan,
Ufa, Dostoevsky str., 109, apt 19.
Phone: +7 (919) 619-85-60.
E-mail: koral@ufanet.ru

Образец цитирования:

А.А. Корженевский, Н.П. Корженевская
«Случай длительной толерантности после
трансплантации почки» // Медицинская иммунология,
2022. Т. 24, № 6. С. 1265-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-ACO-2589

© Корженевский А.А., Корженевская Н.П., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Korzhenevsky, N.P. Korzhenevskaya "A case
of long-term tolerance after kidney transplantation", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 6, pp. 1265-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-ACO-2589

© Korzhenevsky A.A., Korzhenevskaya N.P., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ACO-2589

чение сопротивления кровотоку в стволовой артерии трансплантата. В связи с ухудшением состояния пациент возобновил прием рекомендованных иммуносупрессантов.

Ключевые слова: трансплантация, гломерулонефрит, пиелонефрит, антиген, толерантность, отторжение, циклоспорин, селлсепт, майфортик, метипред, симулект

A CASE OF LONG-TERM TOLERANCE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Korzhenevsky A.A.^{a, b}, Korzhenevskaya N.P.^a

^a G. Kuvatov Republican Clinical Hospital, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

^b Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Abstract. We present a case of long-term organ functioning (ca. 10 years) after allografting of a cadaveric kidney without usage of immunosuppressing drugs. In 2005, a patient suffering from a hypertensive form of chronic glomerulonephritis, have received an allogeneic graft of cadaveric kidney compatible for AB0 system, HLA antigens (A19, B07, DR04), and negative results of cross-match test. The graft function was immediately restored, with normalization of creatinine levels achieved 4-5 days after surgery. Immunosuppression with cyclosporine, solumedrol, cellcept, metypred and simulect was performed in the hospital. Pulse therapy with solumedrol was performed on the day +20 due to the development of initial rejection signs. The postoperative period proceeded without infectious complications. The patient was discharged being recommended to take cyclosporine, Cell-Sept and Metypred. Within a year after transplantation, the patient claimed for pain in the hip joint, and, therefore, metypred was completely canceled. Subsequently, the Cellcept was replaced with a Mayfortic. In 2007, the signs of coxarthrosis were revealed at computed tomography, followed by aseptic necrosis of the the right femur head. Deforming osteoarthritis of the right hip joint was detected, and the hip replacement surgery was suggested. In 2010, due to risk of side effects from ongoing immunosuppressive therapy, e.g., joint damage, the Mayfortic was canceled. In 2012, being in fear of original Sandimmun Neoral replacement by a generic drug, the patient completely refused cyclosporine therapy. In 2021, the endoprosthetics of the right hip joint was performed, and the surgical wound healed initially. Since 2012, the patient has not completely taken immunosuppressive therapy. Over this time period, the patient has never been admitted to the hospital for impaired functioning of the organ graft. Meanwhile, he monitored his graft function on regular basis undergoing biochemical analyses, clinical examination, ultrasound studies of the graft and made regular visits to the outpatient department. In 2021, a week after hip replacement, there was a slight increase in serum creatinine, followed by further increase to 230 mmol/L in 2021, and to 310 mmol/L in March 2022. In February 2022, the patient suffered mild respiratory infection (confirmed COVID-19). In March 2022, the first clinical signs of increasing nephropathy appeared, i.e., swelling of both lower extremities, with leukocytes in urine upon routine analysis, increased blood flow resistance in the main artery of the transplant shown by ultrasound study. Due to worsening of the patient's condition, he resumed taking the prescribed immunosuppressants.

Keywords: transplantation, kidney, glomerulonephritis, pyelonephritis, antigens, tolerance, rejection, cyclosporin, cellcept, myfortic, metypred, simulect

Успехи клинической трансплантологии широко известны. Одной из ее центральных задач является обеспечение длительного полноценного функционирования пересаженного органа.

На сегодня выделяют 3 класса причин, приводящих к дисфункции трансплантированной почки. Один из них — патология трансплантата, обусловленная аллоиммунным ответом, которая проявляется различными вариантами как острого, так и хронического криза отторжения. Второй класс обусловлен хроническим нефротоксическим воздействием на трансплантат ингибиторов

кальциневрина. Третий класс — результат действия разнообразных факторов, которые не связаны с иммуносупрессивной терапией [4].

На сегодняшний день считается, что одной из главных причин, ограничивающих продолжительность функционирования донорской почки, является феномен позднего отторжения. В то же время установлено, что в 2/3 всех случаев причиной формирования дисфункции трансплантата явилась неадекватность иммуносупрессии. Так, при недостаточной дозировке иммуносупрессантов развивалось отторжение трансплантата, а их

передозировка приводила к формированию его нефротоксичного повреждения [4].

Главным принципом современного подхода к назначению иммуносупрессии является комбинация из минимальных доз разных иммуносупрессантов, достаточных для подавления аллоиммунной реакции реципиента при минимизации риска развития побочных эффектов от проводимой иммуносупрессии [1]. При этом решается задача, с одной стороны, в предупреждении инфекционных осложнений, с другой стороны – в профилактике нефротоксических повреждений донорского органа, обусловленных побочным действием иммуносупрессивных препаратов [6, 8].

В литературе встречаются описания применения у некоторых пациентов иммуносупрессивной монотерапии после трансплантации, однако с достаточной уверенностью на сегодняшний день еще не определен наиболее безопасный и эффективный протокол монотерапии [5, 9].

В 1993 г. было опубликовано наблюдение за 6 реципиентами печени, которые самостоятельно прекратили прием иммуносупрессивной терапии. При этом в течение 5-13 лет наблюдения трансплантат у них функционировал нормально [10]. Состояние, когда на фоне отсутствия иммуносупрессивной терапии не наблюдаются гистологические признаки развивающегося повреждения трансплантата и/или его отторжения, получило название операционной толерантности [3].

Нашей целью было наблюдение за пациентом с функционирующим трансплантатом почки, который длительно (около 10 лет) не применял иммунодепрессанты.

Пациент К., 1981 года рождения, с детства наблюдался у педиатра по поводу хронического пиелонефрита, по поводу чего он ежегодно проходил стационарное лечение. Однако в последующем у него был диагностирован хронический гломерулонефрит, гипертоническая форма, осложнившийся исходом в нефросклероз. На программном гемодиализе – с 2001 г. Развились следующие осложнения – миокардиодистрофия, анемия. 20.01.2005 г. ему была проведена аллотрансплантация трупной почки в правую подвздошную область в Республиканской клинической больнице Г.Г. Куватова (г. Уфа) при совместимости по АВ0 системе, антигенам гистосовместимости А19, В07, DR04 и при отрицательном Cross-match. Функция трансплантата была немедленная, нормализация уровня креатинина – на 4-5-е сутки после операции. Послеоперационный период протекал без инфекционных осложнений, заживление раны шло первичным натяжением. Проводилась 4-компонентная иммуносупрессия:

циклоsporин (сандиммун неорал) – начиная с дозы 400 мг/сутки, с последующим снижением до 250 мг, метипред 7 таб/сутки в начальной дозе и снижением до 3^{3/4} таб/сутки, селлсепт 2 г/сутки, солумедрол внутривенно капельно 1000 мг № 1, 500 мг № 1, 250 мг № 1; симулект – по 20 мг (на 1-е и 4-е сутки после операции с целью индукции иммуносупрессии). На 20-е сутки связи с появлением признаков начинающегося криза отторжения (по УЗИ выявлено увеличение размеров трансплантата) проведена пульс-терапия солумедролом внутривенно капельно 500 мг № 3, 250 мг № 1. Выписан домой в удовлетворительном состоянии с диурезом 3,0-3,4 л/сутки, в биохимическом анализе крови уровень мочевины был 9,3 ммоль/л и креатинин 115,0 мкмоль/л, в общем анализе крови содержание лейкоцитов $9,1 \times 10^9$ /л, в общем анализе мочи уровень протеинурии 0,033 г/л. Рекомендован в последующем прием циклоsporина 250 мг/сутки, селлсепта 2,0 г/сутки, метипреда 3^{3/4} таб/сутки с последующим плавным снижением дозы до 2 таб/сутки [2].

После операции трансплантации в 2005 г. у пациента появились боли в тазобедренном суставе, в связи с чем был полностью отменен метипред. В последующем проведена замена селлсепта на майфортин (1440 мг/сутки). Тогда же, в 2005 г., на фоне развившегося опоясывающего герпеса, был кратковременно отменен майфортин. В 2007 г. на компьютерной томографии выявлены признаки коксартроза и встал вопрос о планировании операции по эндопротезированию тазобедренного сустава. В 2008 г. констатирован асептический некроз головки правой бедренной кости, деформирующий остеоартроз правого тазобедренного сустава.

В 2010 г., опасаясь развития побочных эффектов (усугубления поражения суставов, инфекционных заболеваний), пациент самостоятельно отменил себе майфортин. В 2012 г., в связи с заменой централизованно выдаваемого оригинального сандиммун неорала на дженерики, и, опасаясь усугубления побочных эффектов, пациент по собственному желанию полностью отказался от приема циклоsporина. Но при этом он регулярно контролировал функцию трансплантата по результатам биохимических анализов, клинической картине, УЗИ трансплантата и приходил на амбулаторный прием к трансплантологу (от 1 до 4 раз в год). За все это время уровень креатинина в биохимическом анализе крови колебался в пределах 120-140 мкмоль/л, лабораторных и клинических признаков дисфункции трансплантата не отмечалось. По данным УЗИ трансплантат всегда был обычной формы, с четкими контурами, без существенной динамики в размерах, без выявления патологических образований. В общих

анализах мочи только эпизодически выявлялся белок – не более 0,085-0,09 г/л.

За все время после аллотрансплантации пациент был госпитализирован 4 раза: в 2009 г. и 2010 г. – в отделение трансплантации для дообследования и коррекции лечения в связи с нефропатией трансплантата; повторно в 2010 г. – для разобщения артерио-венозной фистулы; в 2021 г. – в отделение травматологии и ортопедии для проведения эндопротезирования правого тазобедренного сустава эндопротезом Пинакл-Кораи (рана зажила первично, швы сняты на 11-е сутки).

Таким образом, с 2012 г. пациент полностью отказался от иммуносупрессивной терапии и ни разу не поступал в стационар по поводу ухудшения функции трансплантата.

По характеру пациент К. – активный, выносливый, настойчиво идущий к своей цели молодой человек. Достаточно открытый, выдержанный, коммуникабельный, умеет налаживать контакт с собеседником. Образован, начитан. Всегда старается адаптироваться к новым условиям окружения, в том числе к своим вновь выявленным заболеваниям, про которые читает много литературы. Он всегда внимательно слушает рекомендации врачей, однако принимает решения исключительно на основе своих собственных умозаключений.

При этом пациент по-своему мотивирован на максимально длительное поддержание своего организма в хорошей физической форме и заинтересован в длительном функционировании трансплантата. После проявления первых признаков коксартроза он сам себе разработал специальную диету, направленную как на снижение собственного веса, так и на восстановление и поддержание функционирования суставного хряща. Для социальной адаптации и выполнения необходимого ежесуточного объема физической нагрузки на тазобедренные суставы пациент устроился на подработку – расклеивал объявления по подъездам домов. При этом объем ежедневной нагруз-

ки четко контролировался по шагомеру. Таким образом, от момента выявления коксартроза до проведения операции по эндопротезированию тазобедренного сустава прошло 14 лет.

В феврале 2022 г. пациент перенес ОРВИ коронавирусной природы в легкой форме.

До последнего времени пациент чувствовал себя хорошо. Клинических, инструментальных и лабораторных признаков нарушения функционирования трансплантата не было. Проходил реабилитацию после эндопротезирования тазобедренного сустава.

Однако 19.04.2021 г. уровень креатинина в биохимическом анализе крови впервые поднялся до 176 мкмоль/л (через неделю после эндопротезирования тазобедренного сустава), 28.09.2021 г. он уже был 230 мкмоль/л.

Первые клинически признаки ухудшения состояния появились в марте 2022 г. в виде появления отечности на обеих нижних конечностях по вечерам. Уровень креатинина в биохимическом анализе крови в марте 2022 г. составил 310 мкмоль/л (табл. 1), общий анализ крови – без особенностей, общий анализ мочи: уровень лейкоцитов – 10-11-12 в п/з (лейкоцитурия выявлена впервые), эритроцитов – 3-4-4 в п/з, белок – 0,099 г/л. По данным УЗИ в марте 2022 г. выявилось некоторое увеличение сопротивления кровотоку в стволовой артерии трансплантата в динамике от 09.2020 г. с 0,65 до 0,72.

В связи с ухудшением состояния и лабораторных показателей с марта 2022 г. пациент возобновил прием циклоспорина в дозе 100 мг в сутки и микофеноловой кислоты 720 мг в сутки. В связи с выявленными признаками нефропатии трансплантата была запланирована госпитализация пациента в отделение трансплантации.

Как показывает общепринятая практика и наш опыт наблюдения за пациентами, после аллотрансплантации как родственных, так и трупных органов, данный случай, конечно же, является, по сути своей парадоксальным и казуистическим. Общеизвестно, что после операции

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА УРОВНЯ КРЕАТИНИНА ЗА ПОСЛЕДНИЕ 2 ГОДА В БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ КРОВИ ПАЦИЕНТА К. ПОСЛЕ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ ТРУПНОЙ ПОЧКИ, ПРОВЕДЕННОЙ В 2005 г., НА ФОНЕ ПОЛНОГО ОТКАЗА ОТ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССАНТОВ

TABLE 1. LAST 2 YEARS DYNAMICS OF CREATININE LEVELS IN THE BIOCHEMICAL ANALYSIS OF PATIENT K.'s BLOOD AFTER ALLOTRANSPLANTATION OF A CADAVERIC KIDNEY PERFORMED IN 2005, AGAINST THE BACKGROUND OF COMPLETE REJECTION OF THE USE OF IMMUNOSUPPRESSANTS

Дата исследования Date of the research	20.02.20	19.04.21	28.09.21	03.03.22	14.04.22
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, mmol/L	113	176	230	310	330

трансплантации как бы не был удачно подобран донорский орган и эффективна индукция иммуносупрессии, аллоиммунный ответ без постоянной иммуносупрессии всегда будет направлен на отторжение пересаженного органа. Поэтому приведенный случай ни в коей мере не может служить основанием для его повторения или отмены общепринятой тактики ведения пациентов после операции трансплантации.

В данном случае мы наблюдали длительно функционирующий трансплантат на фоне отсутствия иммуносупрессивной терапии. Объяснением этому, вероятно, может служить формирование парадоксальной временной трансплантационной толерантности. Чем она была обусловлена — сложно сказать. Совместимость по результатам HLA типирования была хорошая (но не абсолютная), и трансплантация была проведена от трупного, а не от родственного донора. Следовательно, полной идентичности по HLA не было. Первые признаки нарастающей нефропатии (что можно рассматривать как нарушение сформировавшейся толерантности) стали проявляться в виде роста уровня креатинина в сыворотке крови после проведения эндопротезирования тазобедренного сустава. Вероятно, стресс, массивное повреждение собственных тканей, чем обязательно сопровождается данная операция, способствовали активации иммунной реактивности, что повлияло на повышение активности трансплантационного иммунитета. А это, в свою очередь, и привело к манифестации хронического криза отторжения трансплантата.

Предполагается, что иммунная система имеет способность постепенно адаптироваться к чужеродным антигенам пересаженного органа, и при этом может наблюдаться снижение необходимости в поддержании высокого уровня иммуносупрессии [7]. Однако, допуская некоторое улучшение функции трансплантата, безусловно, на этом фоне ожидается возрастание риска его отторжения. Пример с пациентом К. дает возможность взглянуть на способности человеческого организма, и в частности его иммунной системы, формировать различные уровни адаптации в условиях изменившейся действительности. Мы продемонстрировали частный случай, но, вероятно, это была какая-то особая форма взаимоотношений иммунной системы пациента и донорского органа, которая требует дальнейшего наблюдения и научного объяснения.

Возможность целенаправленно формировать такую иммунологическую толерантность, которая избирательно нивелирует иммунный ответ против антигенов пересаженного органа, видится достаточно перспективным направлением в трансплантационной иммунологии [1].

Благодарности

Хотелось бы выразить слова признательности коллективу отделения трансплантации Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова (г. Уфа) — врачам Нуриахметову Р.Р., Мусину И.Р., Мухаметовой Р.Р., Амирхановой И.А., Биганякову И.И., переводчику языковой школы Know and Speak (г. Уфа) Корженевской А.А.

Список литературы / References

1. Ватазин А.В., Кильдюшевский А.В., Федулкина В.А., Фаенко А.П. Механизмы отторжения почечного аллотрансплантата и иммунологическая толерантность // Нефрология, 2016. Т. 20, № 6. С. 33-41. [Vatazin A.V., Kildjushevskiy A.V., Fedulkina V.A., Faenko A.P. Renal allograft rejection mechanisms and immunotolerance. *Nefrologiya = Nephrology*, 2016, Vol. 20, no. 6, pp. 33-41. (In Russ.)]
2. Матевосян Э., Снопок Ю., Долль Д. Клинические аспекты трансплантации почки // Вестник ВГМУ, 2015. Т. 14, № 6. С. 53-63. [Matevossian E., Snopok I., Doll D. Clinical aspects of kidney transplantation *Vestnik VGMU = Bulletin of the Vitebsk State Medical University*, 2015, Vol. 14, no. 6, pp. 53-63. (In Russ.)]
3. Сюткин В.Е., Боровкова Н.В., Новрузбеков М.С. Биомаркеры толерантности и иммунологический мониторинг при трансплантации печени // Трансплантология, 2020. Т. 12, № 2. С.126-134. [Syutkin V.E., Borovkova N.V., Novruzbekov M.S. Biomarkers of tolerance and immunological monitoring in liver transplantation. *Transplantologiya = Russian Journal of Transplantation*, 2020, Vol. 12, no. 2, pp. 126-134. (In Russ.)]
4. Томилина Н.А., Столяревич Е.С., Ким И.Г., Артюхина Л.Ю. Отдаленные результаты трансплантации почки в аспекте разных вариантов поддерживающей иммуносупрессии // Трансплантология, 2014. № 3. С. 6-16. [Tomilina N.A., Stolyarevich E.S., Kim I.G., Artyukhina K.Yu. Long-term outcomes of kidney transplantation in terms of different variants of maintenance immunosuppression. *Transplantologiya = Russian Journal of Transplantation*, 2014, no. 3, pp. 6-16. (In Russ.)]
5. Cole E., Landsberg D., Russell D., Zaltzman J., Kiberd B., Caravaggio C., Vasquez A.R., Halloran P. A pilot study of steroid-free immunosuppression in the prevention of acute rejection in renal allograft recipients. *Transplantation*, 2001, Vol. 72, no. 5, pp. 845-850.
6. Johnson E.M., Remucal M.J., Gillingham K.J., Dahms R.A., Najarian J.S., Matas A.J. Complications and risks of living donor nephrectomy. *Transplantation*, 1997, Vol. 64, no. 8, pp. 1124-1128.

7. Kasiske B., Zeier M., Chapman J., Craig J., Ekberg H., Garvey C., Green M., Jha V., Josephson M., Kiberd B., Kreis H., McDonald R., Newmann J., Obrador G., Vincenti F., Cheung M., Earley A., Raman G., Abariga S., Wagner M., Balk E., Петрушина Е.В. Практическое клиническое руководство KDIGO по ведению пациентов после трансплантации почки // Трансплантология, 2012. № 4. С. 63-66. [Kasiske B., Zeier M., Chapman J., Craig J., Ekberg H., Garvey C., Green M., Jha V., Josephson M., Kiberd B., Kreis H., McDonald R., Newmann J., Obrador G., Vincenti F., Cheung M., Earley A., Raman G., Abariga S., Wagner M., Balk E. KDIGO Clinical Practice Guidelines for the Management of Kidney Transplant Patients. *Transplantologiya = Russian Journal of Transplantation*, 2012, no. 4, pp. 63-66. (In Russ.)]
8. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.*, 2002, Vol. 39, no. 2, Suppl. 1, pp. S1-S266.
9. Stallone G., Infante B., Schena A., Battaglia M., Ditunno P., Loverre A., Gesualdo L., Schena F.P., Grandaliano G. Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, Vol. 16, no. 12, pp. 3755-3762.
10. Starzl T.E. Cell migration and chimerism a unifying concept in transplantation with particular reference to HLA matching and tolerance induction. *Transplant. Proc.*, 1993, Vol. 25, no. 1, Pt 1, pp. 8-12.

Авторы:

Корженевский А.А. — д.м.н., врач — аллерголог-иммунолог ГБУЗ «Республиканская клиническая больница имени Г.Г. Куватова»; доцент кафедры Репродуктивного здоровья человека по курсу иммунологии Института дополнительного профессионального образования, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Корженевская Н.П. — врач отделения функциональной диагностики ГБУЗ «Республиканская клиническая больница имени Г.Г. Куватова», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Authors:

Korzhenevsky A.A., PhD, MD (Medicine), Clinical Allergologist-Immunologist, G. Kuvatov Republican Clinical Hospital; Associate Professor, Department of Human Reproductive Health with the course of Immunology of the Institute of Additional Professional Education, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Korzhenevskaya N.P., Doctor of Functional Diagnostics Department, G. Kuvatov Republican Clinical Hospital, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Поступила 10.10.2022
Принята к печати 15.10.2022

Received 10.10.2022
Accepted 15.10.2022

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
 - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
 - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
 - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
 - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абрамова Т.Я.....	1119	Корженевская Н.П.	1265	Святченко С.В.....	1219
Агарков Н.М.....	1171	Корженевский А.А.....	1265	Сельков С.А.....	1085
Антонюк М.В.	1205	Костюк Г.П.	1159	Сергеев А.А.....	1189
Арлеевская М.И.	1139	Коцарева О.Д.....	1189	Сизиков А.Э.	1119
Баженов Д.О.....	1085	Крутикова И.В.	1179	Смирнова О.В.	1109
Баталов Р.Е.....	1255	Крынский С.А.....	1159	Соколов Д.И.....	1085
Бедина С.А.....	1249	Кузнецова Р.Н.....	1227	Спицина С.С.....	1249
Блинова Е.А.....	1119	Ларионова Р.В.....	1139	Стрельцова М.А.....	1189
Бухтуева Н.Г.....	1151	Лев И.В.....	1171	Сулова Т.Е.....	1255
Бычкова Н.В.....	1179	Леплина О.Ю.	1151	Суслопаров И.М.	1219
Вершинина С.О.	1085	Лугачева Ю.Г.....	1255	Тихонова М.А.....	1151
Габдулхакова А.Г.....	1139	Любимова Н.Е.....	1227	Тоголян Арег А.....	1227
Гершкорон Ф.А.....	1109	Малашенкова И.К.....	1159	Трофименко А.С.....	1249
Гребенкина П.В.....	1085	Мамус М.А.....	1249	Ушаков В.Л.....	1159
Гришина Л.В.....	1119	Минеева Е.Е.....	1205	Фаттахова Г.В.....	1189
Даниленко А.В.....	1219	Михайлова В.А.....	1085	Филина Ю.В.....	1139
Дидковский Н.А.....	1159	Мозговая Е.Э.....	1249	Хайлов Н.А.....	1159
Драгунова М.А.....	1255	Мохаммад А.....	1139	Ходосова К.К.....	1205
Духинова М.С.....	1085	Огуркова О.Н.....	1255	Чекулаева Е.И.....	1159
Захарова Н.В.....	1159	Огурцов Д.П.....	1159	Черных Е.Р.....	1151
Иванова К.И.....	1219	Онхонова Г.С.....	1219	Чернышова А.В.....	1179
Ильина Н.А.....	1119	Останкова Ю.В.....	1227	Чудаков Д.Б.....	1189
Ильичева Т.Н.....	1219	Ошколова А.А.....	1085	Чумасова О.А.....	1119
Ищенко О.В.....	1237	Пасман Н.М.....	1151	Шевела Е.Я.....	1151
Калинина Н.М.....	1179	Пашкина Е.А.....	1119	Шевченко М.А.....	1189
Козлов В.А.....	1119	Ратушный А.Ю.....	1159	Юренко А.В.....	1205
Колосова Н.П.....	1219	Рыжиков А.Б.....	1219	Ярошевич Е.А.....	1171
Коновалова М.В.....	1189	Сайтгалина М.А.....	1227		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

автономное влияние апоптоза....	1120	маннозный рецептор.....	1152	система CD40-40L.....	1256
адипокины.....	1110	метаболический синдром.....	1110	специфические IgE.....	1180
активные формы кислорода.....	1140	метипред.....	1266	спонтанный NETоз.....	1250
аллергены клещей домашней пыли.....	1180	метод диагностики.....	1228	средняя толщина коры.....	1160
антиген.....	1266	молекулы митохондриального апоптоза.....	1120	субпопуляции моноцитов.....	1152
антигенпрезентирующие клетки..	1190	молекулы рецепторного апоптоза.....	1120	тест активации базофилов.....	1180
аргиназа-1.....	1152	молекулярно-генетический анализ.....	1219	тирозинкиназа Мег.....	1152
аэротоксиканты.....	1237	неавтономное влияние апоптоза..	1120	толерантность.....	1266
беременность.....	1152	неалкогольная жировая болезнь печени.....	1110	трансплантация.....	1266
бронхиальная астма.....	1205, 1237	нейтрофилы.....	1250	тромбомодулин.....	1256
взаимодействие.....	1086	низкие дозы антигена.....	1190	тромбообразование.....	1256
внеклеточные ловушки нейтрофилов.....	1250	ожирение.....	1205	тромбоэмболия.....	1256
воспаление.....	1160, 1256	остеоартрит.....	1250	трофобласт.....	1086
врожденный иммунитет.....	1140	отторжение.....	1266	фагоциты.....	1140
гепатоцеллюлярная карцинома...	1110	офтальмологические осложнения сахарного диабета... 1172		факторы транскрипции.....	1110
гиперчувствительность I типа ...	1190	пиелонефрит.....	1266	фибрилляция предсердий.....	1256
гломерулонефрит.....	1266	подкожная жировая ткань.....	1190	формилпептидные рецепторы ...	1140
диабетическая ретинопатия.....	1172	пожилой возраст.....	1172	ХОБЛ.....	1237
иммунный статус.....	1228	популяционный иммунитет.....	1219	циклинзависимые киназы.....	1086
иммунодефицит.....	1228	проточная цитометрия.....	1190	циклоспорин.....	1266
индуцированный NETоз.....	1250	реактивное воспаление.....	1250	цитокины... 1086, 1110, 1160, 1205, 1237	
интерлейкин-17A.....	1160	реакция торможения.....	1219	чувствительность к антинейраминидазным ингибиторам.....	1219
интерлейкины крови.....	1172	гемагглютинация.....	1219	шизофрения.....	1160
«клеточное соседство».....	1120	ревматоидный артрит..... 1120, 1140		CD11b ⁺ классические дендритные клетки.....	1190
когнитивные нарушения.....	1172	референтный интервал.....	1228	IgE.....	1190
кожное тестирование.....	1180	рецепторы.....	1086	KREC.....	1228
корреляционные связи.....	1172	сезонные вирусы гриппа.....	1219	M2-макрофаги.....	1190
лабораторные животные.....	1190	селлсепт.....	1266	M2-поляризация.....	1152
магнитная резонансная томография.....	1160	сигнальные пути.....	1086	NK-клетки.....	1086
майфортик.....	1266	симулект.....	1266	TREC.....	1228
макрофаги.....	1190				
малые дыхательные пути.....	1205				

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >